



(19)

Europäisches Patentamt

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 001 027 A2

A10

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG(43) Veröffentlichungstag:
17.05.2000 Patentblatt 2000/20(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/53, C12N 15/67,
C12N 15/70, C12N 1/21,
C12P 13/02, C12P 7/42

(21) Anmeldenummer: 99118670.1

(22) Anmeldetag: 22.09.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 09.10.1998 DE 19846499

(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60311 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• Elischewski, Frank, Dr.
33818 Leopoldshöhe (DE)

- Kalinowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)
- Dusch, Nikole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Dohmen, Jürgen, Dr.
40760 Meerbusch (DE)
- Farwick, Mike, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Verstärkung von für Ketopantoat-Reduktase kodierende Nukleotidsequenzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung D-Pantothensäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärken für die Ketopantoatreduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens, die diese Nucleotidsequenzen enthaltende Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung D-Pantothensäure bestehend aus der Fermentation dieser Mikroorganismen, der Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und dem Isolieren der D-Pantothensäure.

EP 1 001 027 A2

Beschreibung

Stand der Technik

5 [0001] Die Pantotheninsäure stellt ein kommerziell bedeutendes Vitamin dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet.

[0002] Pantotheninsäure kann durch chemische Synthese oder biotechnisch durch Fermentation geeigneter Mikroorganismen in geeigneten Nährösungen hergestellt werden. Bei der chemischen Synthese ist das DL-Pantolacton eine wichtige Verbindung. Es wird in einem mehrstufigen Verfahren aus Formaldehyd, Isobutyraldehyd und Cyanid hergestellt. In weiteren Verfahrensschritten wird das racemische Gemisch aufgetrennt und D-Pantolacton mit β -Alanin kondensiert, und man erhält D-Pantotheninsäure.

10 [0003] Der Vorteil der fermentativen Herstellung durch Mikroorganismen liegt in der direkten Bildung der gewünschten stereoisomeren D-Form.

[0004] Verschiedene Arten von Bakterien, wie z. B. *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* und auch Hefen, wie z. B. *Debaromyces castellii* können wie in EPA 0 493 060 gezeigt, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, D-Pantotheninsäure produzieren. EPA 0 493 060 zeigt weiterhin, daß bei *Escherichia coli* durch Amplifikation von Pantotheninsäure-Biosynthesegenen, die auf den Plasmiden pFV3 und pFV5 enthalten sind, in einer Nährlösung, die Glucose, DL-Pantoinsäure und β -Alanin enthält, die Bildung von D-Pantotheninsäure verbessert wird.

15 [0005] EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 beschreiben von *Escherichia coli* Stamm IFO3547 abgeleitete Mutanten wie FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 und FV5069 die Resistenzen gegen verschiedene Antimetabolite wie Salizylsäure, α -Ketobuttersäure, β -Hydroxyasparaginsäure, O-Methylthreonin und α -Ketoisovaleriansäure tragen und in einer Nährlösung, die Glucose enthält Pantoinsäure und in einer Nährlösung, die Glucose und β -Alanin enthält, D-Pantotheninsäure produzieren. In EPA 0 590 857 und US-Patent 5,518,906 wird weiterhin gezeigt, daß nach Amplifikation der Pantotheninsäure-Biosynthesegene, die auf dem Plasmid pFV31 enthalten sind, in den oben genannten Stämmen in einer Nährlösung die Glucose enthält die Produktion von D-Pantoinsäure und in einer Nährlösung die Glucose und β -Alanin enthält die Produktion von D-Pantotheninsäure verbessert wird.

20 [0006] In WO 97/10340 wird darüber hinaus gezeigt, daß in Pantotheninsäure bildenden Stämmen von *Escherichia coli* durch Erhöhung der Aktivität des Enzyms Acetohydroxysäure-Synthase II, einem Enzym der Valin Biosynthese, die Pantotheninsäure-Produktion weiter gesteigert werden kann.

Aufgabe der Erfindung

35 [0007] Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Grundlagen für ein verbessertes Verfahren zur Herstellung von Pantotheninsäure bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

40 [0008] Das Vitamin Pantotheninsäure stellt ein kommerziell bedeutendes Produkt dar, das in der Kosmetik, der Medizin, der Humanernährung und in der Tierernährung Anwendung findet. Es besteht daher ein allgemeines Interesse daran verbesserte Verfahren zur Herstellung von Pantotheninsäure bereitzustellen. Wenn im folgenden Text D-Pantotheninsäure oder Pantotheninsäure oder Pantothensäure erwähnt werden, sind damit nicht nur die freie Säure sondern auch die Salze der D-Pantotheninsäure wie z.B. das Calcium-, Natrium-, Ammonium- oder Kaliumsalz gemeint.

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung Pantotheninsäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärkung, insbesondere Überexpression von für die Ketopantaoatreduktase kodierenden Nukleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens.

45 Der Begriff „Verstärkung“ beschreibt in diesem Zusammenhang die Erhöhung der intrazellulären Aktivität eines oder mehrerer Enzyme, die durch die entsprechende DNA codiert werden, indem man die Kopienzahl des(der) Gene erhöht, einen starken Promotor verwendet oder ein Gen verwendet, das für ein entsprechendes Enzym mit einer hohen spezifischen Aktivität codiert und gegebenenfalls diese Maßnahmen kombiniert.

Der insbesondere wurde gefunden, daß bei Überexpression des panE-Gens zusammen mit den Genen panB, panC und panD die Bildung der Pantotheninsäure weiter verbessert wird. Zur Erzielung der Überexpression kann die Kopienzahl der entsprechenden Gene mittels Plasmidvektoren wie z. B. pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) oder pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268) erhöht werden, oder es kann die Promotor- und Regulationsregion, die sich stromaufwärts des Strukturgens befindet, mutiert werden. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die lac-UV5-Mutation des lac-Promoters (Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990). In gleicher Weise wirken Expressionskasset-

ten, die stromaufwärts des Strukturgens eingebaut werden. Diese Methode ist z. B. bei LaVallie et al. (BIO/TECHNOLOGY 11, 187-193 (1993) und in PCT/US97/13359 angewendet worden.

[0009] Alternativ kann weiterhin eine Überexpression der betreffenden Gene durch Veränderung der Medienzusammensetzung und Kulturführung erreicht werden. Ein Beispiel hierfür ist die allseits bekannte Regulation der Expression des lac-Operons durch Glukose und Laktose. Die Erfinder haben darüberhinaus herausgefunden, daß die Überexpression des panE-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, die Resistenzmutationen gegen Metabolite und Antimetabolite wie z. B. Resistenz gegen L-Valin aufweisen. Weiterhin wurde gefunden, daß die Überexpression des panE-Gens sich in Stämmen vorteilhaft auswirkt, die Defektmutationen in Genen von Stoffwechselwegen, wie z.B. dem avtA- oder ilvE-Gen besitzen, die Vorstufen der Pantothensäure umsetzen oder die Pantothensäurebildung mindern.

[0010] Die Mikroorganismen, die Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind, können Pantothensäure aus Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke, Cellulose oder aus Glycerin und Ethanol herstellen. Dabei handelt es sich um Pilze, Hefen oder insbesondere Grampositive Bakterien z. B. der Gattung Corynebacterium oder um Gram-negative Bakterien, wie z. B. die der Enterobacteriaceae. Bei der Familie der Enterobacteriaceae ist besonders die Gattung Escherichia mit der Art Escherichia coli zu nennen. Innerhalb der Art Escherichia coli sind die sogenannten K-12 Stämme wie z. B. die Stämme MG1655 oder W3110 (Neidhard et al.: Escherichia coli and Salmonella. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) oder der Escherichia coli Wildtypstamm IFO3547 (Institut für Fermentation, Osaka, Japan) und davon abgeleitete Mutanten zu nennen. Bei der Gattung Corynebacterium ist insbesondere die Art Corynebacterium glutamicum zu nennen, die in der Fachwelt für ihre Fähigkeit bekannt ist, Aminosäuren zu bilden. Zu dieser Art gehören Wildtypstämme wie z. B. Corynebacterium glutamicum ATCC13032, Brevibacterium flavum ATCC14067, Corynebacterium melassecola ATCC17965 und andere.

[0011] Für die Isolierung des ilvC-Gens und des panE-Gens stellt man sich zunächst eine Mutante beispielsweise von Escherichia coli her, die eine Mutation im ilvC-Gen und panE-Gen trägt.

[0012] Die Nukleotidsequenz des ilvC-Gens von Escherichia coli ist bekannt (Wek and Hatfield, Journal of Biological Chemistry 261, 2441-2450 (1986)). Methoden zur Isolierung chromosomaler DNS sind ebenfalls bekannt (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Durch Wahl geeigneter Primer kann das ilvC-Gen mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion amplifiziert werden (Innis et al., PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press). Anschließend wird es in einen Plasmidvektor eingefügt. Als Plasmidvektoren kommen solche in Frage, die in den entsprechenden Mikroorganismen replizieren können. Für Escherichia coli kommen z.B. die Vektoren pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Science U.S.A. 80 (21), 6557-6561 (1983)) oder pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)), für Corynebacterium glutamicum z.B. der Vektor pJC1 (Cremer et al., Mol. Gen. Genet. 220:478-480 (1990)) oder pEKE2 (Eikmanns et al., Gene 102:93-98 (1991)) oder pZ8-1 (Europäische Patentschrift 0 375 889) und für Saccharomyces cerevisiae z. B. der Vektor pBB116 (Berse, Gene 25: 109-117 (1983)) oder pDG1 (Buxton et al., Gene 37: 207-214 (1985)) für die vorliegende Erfindung in Frage. Methoden zum Einbau von DNA-Fragmenten in Plasmidvektoren sind bei Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) beschrieben. Methoden zur Transformation und Elektroporation sind bei Tauch et al. (FEMS Microbiology Letters 123:343-347 (1994)) beschrieben. Ein Beispiel eines solchen transformierten Stammes ist der Escherichia coli Stamm MG1655/pFE32. Plasmid pFE32 enthält das ilvC-Gen von MG1655 das in den Vektor pBR322 eingebaut wurde. Ein weiteres Beispiel eines solchen transformierten Stammes ist der Corynebacterium glutamicum Stamm ATCC13032/pFE91. Plasmid pFE91 enthält das ilvC-Gen von ATCC13032 das in den Vektor pECm3 eingebaut wurde. Das Plasmid pECm3 ist ein Derivat des Plasmids pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348), dessen Kanamycin-Resistenzgen durch eine BgIII- und BamHI-Restriktion mit anschließender Religation entfernt wurde.

[0013] Zum Einbau einer Mutation in das ilvC-Gen, die dessen Funktion ausschaltet, kann beispielsweise eine Deletion oder Insertion in dieses eingebaut werden. Zur Erzeugung einer Deletion kann mit Hilfe geeigneter Restriktionsenzyme und anschließender Verknüpfung der entstandenen Enden ein innerer Teil der Nukleotidsequenz des Strukturgens entfernt werden. Das auf diese Weise mutierte ilvC-Gen ist funktionslos. In gleicher Weise kann in das ilvC-Gen ein zweites Gen eingebaut werden, daß für eine Resistenz gegen ein Antibiotikum kodiert. Das auf diese Weise mutierte ilvC-Gen ist ebenfalls funktionslos. Das dergestalt mutierte ilvC-Gen kann anschließend in einen Mikroorganismus eingebracht und in dessen Chromosom gegen das Wildtyp-Gen ausgetauscht werden. Methoden, wie dieser Genaustausch durchzuführen ist, sind in der Literatur bekannt. Für Escherichia coli kann die von Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617-4622 (1989)) beschriebene Methode eingesetzt werden, die auf temperatursensitiven Replikationsmutanten des Plasmids pSC101 beruht. Ein derartiges Plasmid ist z. B. pMAK705. Für Corynebacterium glutamicum kann die von Schwarzer und Pühler (BIO/TECHNOLOGY 9, 84-87 (1991)) beschriebene Methode des Genaustauschs verwendet werden, bei der nichtreplikative Plasmidvektoren verwendet werden. Für Saccharomyces cerevisiae ist eine Methode des gezielten Genaustausches bei Roca et al. (Nucleic Acid Research 20(17), 4671-4672 (1992)) beschrieben.

[0014] Ein mutiertes ilvC-Gen kann beispielsweise folgendermaßen aus einem Wildtyp ilvC-Gen hergestellt wer-

EP 1 001 027 A2

den. Das Plasmid pFE32 besteht aus pBR322 in dessen BamHI-Restriktionsschnittstelle das ilvC-Wildtypgen eingebaut wurde. In die KpnI-Schnittstelle des ilvC-Gens von pFE32 wurde das aacC1-Gen eingebaut, das für Resistenz gegen das Antibiotikum Gentamycin kodiert (Schweizer, BioTechniques 15 (5), 831-834 (1993)). Das auf diese Weise erhaltene Plasmid pFE33 enthält das ilvC::aacC1-Allel, das kein funktionsfähiges ilvC-Genprodukt mehr bilden kann.

5 Das ilvC::aacC1-Allel wurde aus dem Plasmid pFE33 entnommen und in die SphI-Schnittstelle des Plasmids pMAK705 eingefügt, wodurch das Plasmid pDB1 entstand. Plasmid pDB1 ist ein zum Allelaustausch befähigter Plasmidvektor der zum einen aus pMAK705 und zum anderen aus dem ilvC::aacC1-Allel besteht. Plasmid pDB1 wurde nach der von Hamilton et al. beschriebenen Methode verwendet, um das in MG1655 vorhandene Wildtyp ilvC-Gen gegen das ilvC::aacC1-Allel auszutauschen. Der auf diese Weise entstandene Stamm wurde als FE4 bezeichnet.

10 [0015] Für die Isolierung einer Mutante von FE4, die eine Mutation im panE-Gen trägt wurde der Stamm FE4 einer Transposon-Mutagenese mit dem Transposon Tn5 unterzogen. Das Transposon Tn5 ist bei Auerswald (COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 45, 107-113 (1981)) beschrieben. Die Methode der Transposon-Mutagenese ist z. B. im Handbuch von Miller, A: Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) beschrieben. Die Methode ist weiterhin bei Simon (Gene 80, 161-169 (1998)) und auch im Handbuch von Hagemann: Gentechnologische Arbeitsmethoden (Gustav Fischer Verlag, 1990) und zahlreichen anderen der Öffentlichkeit zugänglichen Publikationen beschrieben. Weiterhin können Mutanten auch nach Mutagenese mit ultraviolettem Licht oder nach Behandlung mit einer Mutations-auslösenden Chemikalie wie z. B. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidin erzeugt werden. Unter den auf diese Weise erhaltenen Mutanten können nach Prüfung der Wuchsstoffbedürfnisse insbesondere des Pantothenäure-

15 Bedürfnisses solche Mutanten isoliert werden, die eine Mutation in einem Gen der Pantothenäure-Biosynthese tragen. Von besonderem Interesse sind solche Pantothenäure bedürftigen Mutanten, die nicht Ketopantoat aber Pantoat als Wuchsstoff verwerten können und somit in dem für die Ketopantoat-Reduktase (EC 1.1.1169) kodierendem panE-Gen mutiert sind. Ein Beispiel hierfür ist der auf diese Weise erhaltene Stamm FE5, der neben der ilvC::aacC1-Mutation eine panE::Tn5-Mutation trägt.

20 [0016] Mikroorganismen, die eine Defektmutation im ilvC- und panE-Gen tragen wie beispielsweise der Escherichia coli Stamm FE5, können als Klonierwirte zur Isolierung des ilvC- und des besonders interessierenden panE-Gens oder von Nukleotidsequenzen, die für Proteine mit Ketopantoatreduktase-Aktivität kodieren, verwendet werden.

[0017] Hierzu wird von dem interessierenden Mikroorganismus eine Genbank angelegt. Das Anlegen von Genbanken ist in allgemein bekannten Lehrbüchern und Handbüchern niedergeschrieben. Als Beispiel seien das Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder das Handbuch von Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) genannt. Eine bekannte Genbank ist die des E. coli K-12 Stammes W3110, die von Kohara et al. (Cell 50, 495 - 508 (1987)) angelegt wurde. Genbanken verschiedener Mikroorganismen können mittlerweile käuflich erworben werden wie beispielsweise eine Genbank von Saccharomyces pombe Stamm Sp63 der Firma Stratagene (Heidelberg, Deutschland) im Plasmid Lambda FIX II (Elgin, Strategies 4: 6-7(1991)), eine Genbank des Escherichia coli Stammes W1485 der Firma CLONTECH (Heidelberg, Deutschland) im Plasmid pGAD10 (Kitts, CLONTECH (Heidelberg, Deutschland) Vectors On Disc version 1.3, 1994), dessen Nukleotidsequenz unter der GenBank accession number U13188 zugänglich ist. Die auf die oben beschriebene Art und Weise hergestellte Genbank kann dann in den oben beschriebenen Wirt FE5 durch Transformation eingebracht werden. So wurde beispielhaft die pGAD10 - Genbank von W1485 in den Stamm FE5 durch Transformation eingebracht und die erhaltenen Transformanten auf ihre Fähigkeit untersucht auf einem Pantothenäure freiem Nährboden zu wachsen. Die in der Plasmid-DNA der erhaltenen Pantothenäure prototrophen Transformanten enthaltenen Insertionen kann durch Bestimmung der Nukleotidsequenz untersucht werden. Methoden zur Bestimmung von Nukleotidsequenzen können beispielsweise bei Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Science USA 74:5463-5467 (1977)) nachgelesen werden. Nukleotidsequenzen können Genen mittels Homologieuntersuchungen zugeordnet werden. Eine Möglichkeit für diese Homologiesuche bietet der Vergleich mit Nukleotidsequenzen der EMBL und GenBank Datenbanken, die mittels des BLAST E-mail Service (Altschul, Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)) durchgeführt werden können. Ein Beispiel einer solchen Transformante ist der Escherichia coli Stamm FE5/pFEBank16 der das panE-Gen des E. coli Stammes MG1655 trägt.

45 [0018] Das auf die beschriebene Weise isolierte und identifizierte panE-Gen kann anschließend in einem gewünschten Mikroorganismus zur Expression gebracht werden. Hierzu wird es durch Plasmidvektoren amplifiziert. Diese wiederum können mit Signalstrukturen ausgerüstet sein, die für eine effiziente Transkription und Translation sorgen. Eine Übersicht über Expressionsvektoren findet man beispielsweise in dem Lehrbuch von Winnacker: Gene und Klone, Eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Deutschland, 1990) oder bei Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Weiterhin können Expressionssignale wie z. B. der tac-Promotor stromaufwärts des panE-Gens in das Chromosom eingelegt werden. Derartige Methoden sind in WO 98/04715 beschrieben. Das zu exprimierende panE-Gen kann aus dem klonierten chromosomal DNA - Fragment entnommen werden oder es kann wiederum mit Hilfe der Polymerase - Kettenreaktion amplifiziert

werden. Die in dem betreffenden Mikroorganismus vorhandene Menge an Ketopantoat-Reduktase kann mit Hilfe des von Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt werden. Ein Beispiel eines derartigen Stammes ist der Escherichia coli Stamm MG1655/pFE65. Plasmid pFE65 besteht aus dem Vektor pKK223-3 in dessen EcoRI-Restriktionsschnittstelle das panE-Gen von Escherichia coli MG1655 eingebaut wurde.

[0019] Erfindungsgemäß hat es sich als vorteilhaft erwiesen, zusätzlich zu dem für die Ketopantoat-Reduktase kodierenden panE-Gen eines oder mehrere Gene der Pantothenäure-Biosynthese zu verstärken, insbesondere zu überexprimieren. Hierzu gehören die Gene die für die Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), Aspartat-1-Decarboxylase (EC 4.1.1.11) und Pantothensäure-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren. In Escherichia coli tragen diese Gene die Bezeichnung panB, panD und panC (Miller, A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)). Hierzu können die Gene in verschiedene kompatible Plasmidvektoren eingebaut werden. Beispiele hierfür sind bei Bartolome et al. (Gene 102, 75-78 (1991) beschrieben. Weiterhin kann die Genexpression durch Veränderung der stromaufwärts gelegenen chromosomal Signalstrukturen erhöht werden. Weiterhin können die betreffenden Gene nacheinander angeordnet unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promoters gestellt und in einen Plasmidvektor eingebaut und in einen geeigneten Mikroorganismus eingeführt werden. Ein Beispiel hierfür ist der Escherichia coli Stamm MG1655/pFE80. Das Plasmid pFE80 besteht aus dem Plasmid pKK223-3, das die Gene panB, panD, panC und panE in der angegebenen Reihenfolge enthält. Stromaufwärts des panB-Gens ist in pFE80 der tac-Promotor als Expressionssignal enthalten.

[0020] Es hat sich weiterhin als vorteilhaft erwiesen, das panE-Gen und die Expressionseinheit bestehend aus den Genen panB, panD, panC und panE in Wirtsstämmen zu überexprimieren, die chromosomale Mutationen enthalten.

[0021] Es können Mutationen einzeln oder gemeinsam verwendet werden, die Resistzenzen gegen Stoffwechselprodukte wie z. B. L-Valin oder α -Ketoisovaleriansäure oder gegen Analoga von Stoffwechselprodukten wie z. B. β -Hydroxyasparaginsäure oder O-Methylthreonin bewirken. Derartige Mutanten treten spontan auf oder können nach 25 Mutagenese mit ultraviolettem Licht oder nach Behandlung mit einer Mutations-auslösenden Chemikalie wie z. B. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanid erzeugt werden und anschließend auf Agarplatten, die die entsprechenden Substanzen enthalten, selektioniert werden. Verfahren zur Mutationsauslösung und Selektion sind allgemein bekannt und können unter anderem bei Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)) oder im Handbuch "Manual of Methods for 30 General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA) nachgelesen werden. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Escherichia coli Stamm FE6, die als spontan auftretende, gegen L-Valin resiente Mutante des Stammes MG1655 isoliert wurde.

[0022] Weiterhin können gezielt ungünstige oder störende, chromosomal kodierte Stoffwechselreaktionen ausgeschaltet werden. Hierzu werden in die entsprechenden Gene Insertionen oder Deletionen eingefügt und die auf diese Weise entstandenen mutierten Gene beziehungsweise Allele in das Chromosom des betreffenden Wirtes eingebaut. Es können die Methoden eingesetzt werden, die oben für die Mutation des ilvC-Gens beschrieben worden sind. Ein Beispiel für eine derartige Mutante ist der Escherichia coli Stamm FE7, der eine avtA::aadB-Mutation im Chromosom trägt. Hierbei handelt es sich um den Stamm MG1655 in dessen avtA-Gen das Resistenz gegen Streptomycin vermittelnde aadB-Gen aus Plasmid pHp45Ω (Prentki und Krisch, Gene 29, 303-313 (1984)) eingesetzt wurde.

[0023] In den auf diese Weise hergestellten Wirtsstämmen kann dann das panE-Gen allein oder in Kombination mit anderen Genen überexprimiert werden. Beispiele hierfür sind die Stämme FE6/pFE80 und FE7/pFE80.

[0024] Die erfindungsgemäß hergestellten Mikroorganismen können kontinuierlich oder diskontinuierlich im batch-Verfahren oder im fed batch (Zulaufverfahren) oder repeated fed batch Verfahren (repetitives Zulaufverfahren) zum Zwecke der Pantothenäure-Produktion kultiviert werden. Eine Zusammenfassung über bekannte Kultivierungsmethoden ist im Lehrbuch von Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) oder im Lehrbuch von Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)) beschrieben.

Das zu verwendende Kulturmedium muß in geeigneter Weise den Ansprüchen der jeweiligen Mikroorganismen genügen. Beschreibungen von Kulturmedien verschiedener Mikroorganismen sind im Handbuch "Manual of Methods for General Bacteriology" der American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981) enthalten. Als Kohlenstoffquelle können Zucker und Kohlenhydrate wie z.B. Glucose, Saccharose, Lactose, Fructose, Maltose, Melasse, Stärke und Cellulose, Öle und Fette wie z. B. Sojaöl, Sonnenblumenöl, Erdnussöl und Kokosfett, Fettsäuren wie z. B. Palmitinsäure, Stearinäure und Linolsäure, Alkohole wie z. B. Glycerin und Ethanol und organische Säuren wie z. B. Essigsäure verwendet werden. Diese Stoffe können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Stickstoffquelle können organische Stickstoff haltige Verbindungen wie Peptone, Hefeextrakt, Fleischextrakt, Malzextrakt, Maisquellwasser, Sojabohnenmehl und Harnstoff oder anorganische Verbindungen wie Ammoniumsulfat, Ammoniumchlorid, Ammoniumphosphat, Ammoniumcarbonat und Ammoniumnitrat verwendet werden. Die Stickstoffquellen können einzeln oder als Mischung verwendet werden. Als Phosphorquelle können Phosphorsäure, Kaliumdihydrogenphosphat

EP 1 001 027 A2

oder Dikaliumhydrogenphosphat oder die entsprechenden Natrium haltigen Salze verwendet werden. Das Kulturmedium muß weiterhin Salze von Metallen enthalten wie z.B. Magnesiumsulfat oder Eisensulfat, die für das Wachstum notwendig sind. Schließlich können essentielle Wuchsstoffe wie Aminosäuren und Vitamine zusätzlich zu den oben genannten Stoffen eingesetzt werden. Dem Kulturmedium können überdies Vorstufen der Pantothenäsäure wie β -Alanin oder Ketopantoinsäure und deren Salze zugesetzt werden. Die genannten Einsatzstoffe können zur Kultur in Form eines einmaligen Ansatzes hinzugegeben oder in geeigneter Weise während der Kultivierung zugefüllt werden.

[0024] Zur pH - Kontrolle der Kultur werden basische Verbindungen wie Natriumhydroxid, Kaliumhydroxid, Ammoniak, oder saure Verbindungen wie Phosphorsäure oder Schwefelsäure in geeigneter Weise eingesetzt. Zur Kontrolle der Schaumentwicklung können Antischaummittel wie z.B. Fettsäurepolyglykolester oder Silikonöle eingesetzt werden.

5 Zur Aufrechterhaltung der Stabilität von Plasmiden können dem Medium geeignete selektiv wirkende Stoffe z.B. Antibiotika hinzugefügt werden. Um aerobe Bedingungen aufrechtzuerhalten werden Sauerstoff oder Sauerstoff haltige Gasmischungen wie z.B. Luft in die Kultur eingetragen. Die Temperatur der Kultur liegt normalerweise bei 20°C bis 10 50°C und vorzugsweise bei 25°C bis 45°C. Die Kultur wird solange fortgesetzt bis sich ein Maximum an Pantothenäsäure gebildet hat. Dieses Ziel wird normalerweise innerhalb von 10 Stunden bis 160 Stunden erreicht.

15 [0025] Die Konzentration an gebildeter Pantothenäsäure kann mit bekannten Verfahren (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)) bestimmt werden.

[0026] Folgende Mikroorganismen wurden bei der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt:

20 • Escherichia coli K12 Stamm FE5 als DSM12378
• Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE32 als DSM12413
• Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE65 als DSM12382
25 • Escherichia coli K12 Stamm MG1655/pFE80 als DSM12414
• Escherichia coli K12 Stamm FE6 als DSM12379
30 • Escherichia coli K12 Stamm FE7 als DSM12380

[0027] Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren wird dem Fachmann ein neues Werkzeug an die Hand gegeben, um die Pantothenäsäurebildung von Mikroorganismen gezielt zu verbessern.

35 Beispiele

[0028] Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Beispiel 1

40 Herstellung einer ilvC::aacC1 panE::Tn5 Mutante von Escherichia coli K12 Stamm MG1655

1. Herstellung der ilvC::aacC1 Mutante

45 [0029] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das ilvC-Gen in E. coli K12 MG1655, (EMBL-GenBank: Accession Nr. M87049) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1500 bp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode von Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press) amplifiziert werden. Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits (Macherey-Nagel (Düren, Deutschland), Produktbeschreibung NucleoSpin C + T, Art.-Nr. 740952) isoliert. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

50 [0030] PCR-Primer für das ilvC-Gen aus E. coli:

ilvC1	5'-AGAAGCACAAACATCACGAGG	-3'
ilvC2	5'-CTCCAGGAGAAGGCTTGAGT	-3'

[0031] Das PCR-Produkt des ilvC-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' trans-

formiert (Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01).

[0032] Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1ilvC mit den Restriktionszymen EagI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EagI, Code no. 27-0885-01), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRI, Code no. 27-0884-03) und KpnI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung KpnI, Code no. 27-0908-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits (QIAGEN (Hilden, Deutschland), Cat. no. 27106) isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm).

[0033] Zur Isolation des ilvC-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1ilvC wurde die isolierte Plasmid DNA mit den Enzymen HindIII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung HindIII, Code no. 27-0860-01) und XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-01) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,5 kbp ilvC-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert (GIBCO BRL (Eggenstein, Deutschland), Produktbeschreibung GLASSMAX™ Spin Cartridges, Cat. no. 15590-052). Das isolierte ilvC-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und XbaI gespaltenen Plasmid pMAK705 (Hamilton et al., Journal of Bacteriology 1989, 171: 4617-4622) mittels T4 DNA Ligase (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung T4 DNA Ligase, Code no. 27-0870-03) ligiert und der E. coli Stamm DH5αmr (Grant, Proceedings of the National Academy of Science 1990, 87: 4645-4649) mit dem Ligationsansatz elektroporiert (Tauch, FEMS Microbiology Letters 1994, 123: 343-347). Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar (Lennox, Virology 1955, 1: 190), welcher mit 25 µg/ml Chloramphenicol (Sigma (Deisenhofen, Deutschland) (Deisenhofen, Deutschland), Code no. C 0378) versetzt war und 24 Stunden Inkubation bei 30°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen HindIII, XbaI und KpnI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE30 bezeichnet.

[0034] Zur Isolation des ilvC-Gens aus dem Plasmid pFE30 wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BamHI, Code no. 27-0868-03) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,5 kbp ilvC-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte ilvC-Fragment wurde mit dem ebenfalls BamHI gespaltenen Plasmid pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100 µg/ml Ampicillin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. A 9518) versetzt war und 24 Stunden Inkubation bei 37°C. Erhaltene Kolonien wurden parallel auf LB+Ampicillin-Agar und LB+(5µg/ml)Tetracyclin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. T3383) angeimpft. DNA aus Tetracyclin sensiblen Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer BamHI- und KpnI-Spaltung und anschließender Auf trennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert. Das konstruierte Plasmid wurde pFE32 genannt.

[0035] In die KpnI-Schnittstelle des Plasmids pFE32 wurde ein aacC1-Gen kloniert und das erhaltene Plasmid mit pFE33 bezeichnet. Das aacC1-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein KpnI-Restriktionsansatz des Plasmids pMS255 (Becker, Gene 1995, 162: 37-39) aufgetrennt wurde. Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm DH5αmr wurden die Transformanten auf PA-Agar (Sambrook, Molecular cloning, 2nd edn, Cold Spring Harbor, 1989), welcher mit 10 µg/ml Gentamycin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. G3632) versetzt war, selektiert. DNA aus Gentamycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer BamHI- und KpnI-Spaltung und anschließender Auf trennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert.

[0036] Das ilvC::aacC1-Fragment wurde aus dem Plasmid pFE33 mittels SphI-(Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung SphI, Code no. 27-0951-01) Restriktion gespalten, im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) aufgetrennt und mit dem GLASSMAX™ Kit isoliert. Das Fragment wurde mit dem SphI gespaltenem Plasmid pMAK705 mittels T4-DNA-Ligase ligiert, der Ligationsansatz in den Stamm DH5αmr elektroporiert und Transformanten durch Inkubation auf PA+Gentamycin-Agar für 24 Stunden bei 30°C selektiert. DNA aus Gentamycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer SphI- und EcoRI-Spaltung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) nachgewiesen. Das konstruierte Plasmid wurde mit pDB1 bezeichnet.

[0037] Mit Hilfe des Plasmids pDB1 wurde in dem Stamm E. coli K12 MG1655 das chromosomal ilvC-Gen gegen das unterbrochene ilvC::aacC1-Fragment ausgetauscht. Für den Genaustausch wurde eine modifizierte Methode nach Hamilton et al. verwendet. Das Plasmid pDB1 wurde in den E. coli K12 MG1655 Stamm elektroporiert, anschließend wurden die Transformanten zur Selektion auf Cointegrate auf LB-Chloramphenicol-Agar bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden zur Vereinzelung wiederum auf dem gleichen Medium ausgestrichen und bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Desintegration des Plasmids wurden Einzelkolonien in 5ml LB-Flüssigmedium bei 42°C für 24 Stunden inkubiert, und anschließend eine Verdünnungsreihe des Flüssigmediums auf LB-Chloramphenicol-Agar ausplattiert. Diese Verdünnungsreihe wurde bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Kurierung vom Plasmid

EP 1 001 027 A2

wurden aus der Verdünnungsreihe erhaltene Einzelkolonien in 3 aufeinanderfolgenden Einzelkolonieausstrichen auf LB-Agar bei 42°C für jeweils 24 Stunden angezogen. Zur Kontrolle des Phänotyps wurden die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf Agarplatten mit folgenden Medien angeimpft: Medium E (Vogel, Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) + Glucose (0,4%), MediumE + Glucose (0,4%) (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. G8270)+

5 50µg/ml Isoleucin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. I7268), MediumE + Glucose (0,4%) + 50µg Ketoisovalerat (ICN (Eschwege, Deutschland), Code no. 151395), MediumE + Glucose (0,4%) + 50µg/ml Isoleucin+50µg Ketoisovalerat, PA-Medium + Gentamycin und LB-Medium + Chloramphenicol. Diese Medien wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter 150 getesteten Einzelkolonien befand sich eine deren Phänotyp den Austausch des chromosomalen ilvC-Gens durch das ilvC::aacC1-Fragment anzeigen. Dieser Stamm wurde mit FE4 bezeichnet.

10 2. Herstellung der ilvC::aacC1 panE::Tn5 Doppelmutante

[0038] Der Stamm FE4 wurde in 5ml LB-Flüssigmedium + 10mM MgSO₄ + 0,2% Maltose (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. M5885) (LBMgMal) bei 37°C bis zu einer optischen Dichte von 0,5 angezogen. Die Messung der optischen Dichte erfolgte mit einem Pharmacia (Freiburg, Deutschland) Novaspec II Photometer bei einer Wellenlänge von 660 nm. 2ml der Bakterienlösung wurden 5min bei 3000rpm abzentrifugiert (Beckmann Model J2-21 Centrifuge, Rotor JA-17). Nach Aufnahme des Pellets mit 0,5ml LBMgMal- Flüssigmedium wurde die Suspension mit 30µl λ::Tn5(Simon, Gene 1989, 80(1):161-169)-Lysat, ca. 10⁸ Bakteriophagen, versetzt. Dieses Lysat wurde aus dem Stamm E. coli K12 C600 (Appleyard, Genetics 1954, 39:440-452) isoliert, nach der Methode von Hagemann (Gentech-nologische.Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, 1990: 14-18). Die Suspension mit dem λ::Tn5-Lysat wurde für 45 Minuten bei 30°C inkubiert. Nach Abzentrifugation bei 3000rpm für 5 Minuten wurde das Pellet in 10ml PA + 10mM Pyrophosphat aufgenommen und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Bakterienlösung wurde als Verdünnungsreihe auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat ausplattiert und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Einzelkolonien wurden parallel auf MediumE-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat und auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat angeimpft und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Unter 14000 angeimpften Einzelkolonien konnte eine, als FE5 bezeichnete Kolonie, identifiziert werden welche auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat + 50µg/ml Pantothenat wuchs, nicht aber auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 25µg/ml Kanamycin + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat.

3. Charakterisierung der Stämme FE4 und FE5

[0039] Zusammen mit den E. coli Stämmen SJ2 (Jakowski, Genetic Stock Center, Yale University), der eine Mutation im panB-Gen trägt, MW6 (Williams, Genetic Stock Center, Yale University), der eine Mutation im panC-Gen trägt, und DV9 (Vallari, Journal of Bacteriology 1985, 164:136-142), der eine Mutation im panD-Gen trägt, sowie einem Wildtyp wurden die Stämme FE4 und FE5 auf unterschiedlich supplementierten Grundmedien (Medien E-Agar + Glucose (0,4%) + 50µg/ml Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat; bei SJ2, DV9 und MW6 zusätzlich 50 µg/ml Thiamin) ausgestrichen und bei 37°C für 48 Stunden inkubiert. Als zusätzliche Supplamente wurden Pantothenat (Calcium-Salz), Keto-pantoat (Natrium- Salz), β-Alanin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. A7752) und Pantoat (Kalium-Salz) verwendet. Ketopantoat wurde aus Ketopantolacton durch Behandlung mit äquimolaren Mengen an NaOH bei 60°C und anschließendem Eindampfen hergestellt. Ketopantolacton wurde nach Ojima et al. (Organic Synthesis 63, 18 (1985)) synthetisiert. Pantoat wurde aus Pantoyllacton (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. P2625) nach der Methode von Primerano und Burns (Journal of Bacteriology 1983, 153: 259-269) hergestellt. Das Ergebnis des Wachstumstests (Tabelle 1) zeigte, daß der Stamm FE4 auf allen unterschiedlich supplementierten Grundmedien wuchs. Der Stamm FE5 wuchs nur auf Medien, die entweder mit Pantothenat oder Pantoat supplementiert waren, nicht aber auf Grundmedien die mit Ketopantoat versetzt waren.

Tabelle 1

Stamm	Supplemente des Grundmediums				
	keine	β -Alanin [50 μ g/ml]	Ketopantoat [50 μ g/ml]	Pantoat [50 μ g/ml]	Pantothenat [50 μ g/ml]
MG1655	+	+	+	+	+
SJ2	-	-	+	+	+
MW6	-	-	-	-	+
DV9	-	+	-	-	+
FE4	+	+	+	+	+
FE5	-	-	-	+	+

+ = Wachstum

- = kein Wachstum

Beispiel 2

30 Isolierung des panE-Gens von Escherichia coli K12 Stamm W1485

[0040] In den Stamm FE5 wurde die E. coli K12 W1485 MATCHMAKER Genomic Library (CLONTECH (Heidelberg, Deutschland), Cat. no. XL4001AB) elektroporiert. Die E. coli K12 MATCHMAKER Genomic Library enthält die chromosomal DNA von E. coli K12 W1485 als durchschnittlich 1,0 kbp große Inserts in dem Plasmid pGAD10, die Größe der einzelnen Inserts variiert dabei von 0,5 - 3,0 kbp (CLONTECH (Heidelberg, Deutschland)). Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 100 μ g/ml Ampicillin + 50 μ g/ml Isoleucin + 50 μ g/ml Ketoisovalerat. Aus 20 erhaltenen Kolonien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits die Plasmid DNA isoliert. Durch eine EcoRI-Spaltung der Plasmid DNA und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) wurde gezeigt, daß es sich bei den Plasmiden um 20 pGAD10 Vektoren mit unterschiedlich großen Inserts handelte. Die Sequenzierung (IT Biotech (Bielefeld, Deutschland)) der Inserts ergab, durch Homologievergleiche mit dem BLAST-Programm (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410), daß die Inserts in 7 Fälle ein vollständiges ilvC-Gen und in 13 Fällen ein offenes Leseraster enthielten, der mit "ähnlich zu Salmonella typhimurium apbA" bezeichnet wurde (EMBL-GenBank: Accession Nr. U82664). Dieser offene Leseraster wurde mit panE bezeichnet.

45

Beispiel 3

Überexpression des ilvC-Gens von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

50 [0041] Zur Überexpression des ilvC Gens wurde das Plasmid pFE32 (siehe Beispiel 1) verwendet. Die Kodierregion des ilvC-Gens steht im Plasmid pFE32 unter der Kontrolle des vom Plasmid pBR322 kodierten tet-Promoters. Das Plasmid pFE32 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt war, nach anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als MG1655/pFE32 bezeichnet.

55

EP 1 001 027 A2

Beispiel 4

Überexpression des panE-Gens von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

5 [0042] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das panE-Gen in E. coli K12 MG1655 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1000 bp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits isoliert. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

10 [0043] PCR-Primer für das panE-Gen aus E. coli:

panE1	5'-AGGAGGGACAATGAAAATTAC	-3'
panE2	5'-TCAGTCTCTTCACTACCAGG	-3'

15 [0044] Das PCR-Produkt des panE-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande), Produktbeschreibung Original TA Cloning® Kit, Cat. no. KNM2030-01). Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1panE mit den Restriktionsenzymen EcoRI und HincII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung HincII, Code no. 27-0858-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm).

20 [0045] Zur Isolation des panE-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panE wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 1,0 kbp panE-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panE-Fragment wurde mit dem ebenfalls 25 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI und HincII in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE65 bezeichnet.

30 [0046] Die Kodierregion des panE-Gens steht im Plasmid pFE65 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promoters. Das Plasmid pFE65 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transfanten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als E. coli K12 MG1655/pFE65 bezeichnet.

35 Beispiel 5

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in E. coli K12 Stamm MG1655

40 [0047] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das panB-Gen, panC-Gen und panD-Gen in E. coli K12 MG1655 (EMBL-GenBank: Accession Nr. L17086) wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Mit den panB Primern konnte ein ca. 800 bp großes DNA-Fragment, mit den panD Primern ein ca. 400 bp großes DNA-Fragment unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Mit den 45 panC Primern konnte ein ca. 850 bp großes DNA-Fragment mittels einer modifizierten Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die Tag-Polymerase wurde durch die Pfu-Polymerase ersetzt und die Pufferbedingungen im PCR-Ansatz entsprechend modifiziert (STRATAGENE (Heidelberg, Deutschland), Produktbeschreibung Pfu-Polymerase, Code no. 600135). Die für die PCR eingesetzte chromosomal E. coli K12 MG1655 DNA wurde mittels des NucleoSpin C + T Kits isoliert. Die Größe aller Amplifikate wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

50 [0048] PCR-Primer für das panB-Gen aus E. coli:

panB1	5'-AGGATACGTTATGAAACCGA	-3'
55 panB2	5'-ACAACGTGACTCCTTAATGG	-3'

[0049] PCR-Primer für das panC-Gen aus E. coli:

EP 1 001 027 A2

panC1 5'-AGGAGTCACGTTGTGTTAAT -3'

panC2 5'-AAGTATTACGCCAGCTCGAC -3'

5 [0050] PCR-Primer für das panD-Gen aus E. coli:

panD1 5'-AGGTAGAACGTTATGATTGCGC -3'

panD2 5'-TAACAATCAAGCAACCTGTA -3'

10 [0051] Das PCR-Produkt des panB-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg des panB-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids PCR®2.1panB mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung EcoRV, Code no. 27-0934-01) und Pvull (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Pvull, Code no. 27-0960-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das PCR-Produkt des panD-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg des panD-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1panD mit den Restriktionsenzymen EcoRI, EcoRV und HinclI nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das PCR-Produkt des panC-Gens wurde in das Plasmid pUC19 (Viera, Gene 1982 19:259-268) und in den E. coli Stamm DH5αmcr elektroporiert. Der Klonierungserfolg des panC-PCR-Produktes wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pUC19panC mit den Restriktionsenzymen EcoRI, HindIII und Sall (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sall, Code no. 27-0882-01) nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). Das konstruierte Plasmid wurde pFE60 genannt.

15 [0052] Zur Isolation des panB-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panB wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 800 bp panB-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panB-Fragment wurde mit dem ebenfalls 20 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese 25 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV und Pvull in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE40 bezeichnet. Die Kodierregion des panB-Gens steht im Plasmid pFE40 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors.

30 [0053] Zur Isolation des panD-Gens aus dem Plasmid pCR®2.1panD wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym EcoRI gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 400 bp panD-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panD-Fragment wurde mit dem ebenfalls 35 EcoRI gespaltenen Plasmid pKK223-3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese 40 im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV und HinclI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE50 bezeichnet. Die Kodierregion des panD-Gens steht im Plasmid pFE50 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors.

45 [0054] Das panC-Gen wurde mittels einer HindIII-Smal (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Smal, Code no. 27-0942-01) -Spaltung aus dem Plasmid pFE60 isoliert, dazu wurde der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 850 bp panC-Fragment mit Hilfe des GLASS-50 MAX™ Kits isoliert. Das isolierte panC-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und Smal gespaltenen Plasmid pFE50 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm DH5αmcr mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV, Smal, HindIII und HinclI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE52 bezeichnet. Die Kodierregion des panD-Gens und des panC-Gens stehen im Plasmid pFE52 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors und bilden ein Operon.

55 [0055] In die auf den tac-Promotor folgende EcoRI-Schnittstelle des Plasmids pFE52 wurde das panB-Gen kloniert

EP 1 001 027 A2

und das erhaltene Plasmid mit pFE70 bezeichnet. Das panB-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein EcoRI-Restriktionsansatz des Plasmids pFE40 aufgetrennt wurde. Ligation erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm SJ2 wurden die Transformanten auf MediumE-Agar, welcher mit 0,4% Glucose, 100µg/ml Thiamin und 100µg/ml Ampicillin versetzt war, selektioniert. DNA aus

5 Ampicillin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer EcoRI-, EcoRV-, SmaI-, HindIII- und HincII-Spaltung und anschließender Auf trennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert. Die Kodierregion des panB-Gens, panD-Gens und des panC-Gens stehen im Plasmid pFE70 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten tac-Promotors und bilden ein Operon.

[0056] Das panE-Gen wurde mittels einer HindIII-SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung SphI, Code no. 27-0951-01) -Spaltung aus dem Plasmid pFE65 isoliert, dazu wurde der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das panE-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte panE-Fragment wurde mit dem ebenfalls HindIII und partiell SphI gespaltenen Plasmid pFE70 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der Stamm FE5 mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragen de Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf MediumE-Agar + Glucose (0,4%) + 50µg/ml

10 Isoleucin + 50µg/ml Ketoisovalerat, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war und anschließender Inkubation für 48 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gel-elektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit den Enzymen EcoRI, EcoRV, SphI, HindIII und HincII in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE80 bezeichnet. Die Kodierregion des panB-Gens, panD-Gens, panC-Gens und des panE-Gens stehen im Plasmid pFE80 unter der Kontrolle des vom Plasmid pKK223-3 kodierten

15 tac-Promotors und bilden ein Operon.

[0057] Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm E. coli K12 MG1655 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als MG1655/pFE80 bezeichnet.

25 Beispiel 6

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in einer Valin-resistenten Mutante von E. coli K12 MG1655

30 [0058] Der E. coli K12 Stamm MG1655 wurde auf MediumE-Agar, welcher mit 0,4% Glucose und 100 µg/ml Valin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), V0258) versetzt war, ausgestrichen. Nach 48 Stunden Inkubation bei 37°C konnte eine Kolonie isoliert werden. Dieser Stamm wurde mit FE6 bezeichnet. Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm FE6 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 100µg/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als FE6/pFE80 bezeichnet.

35 Beispiel 7

Überexpression des panE-Gens von E. coli zusammen mit panB, panC und panD von E. coli in einer avtA::aadB-Mutante von E. coli K12 MG1655

40 [0059] Ausgehend von der Nukleotidsequenz für das avtA-Gen (EMBL-GenBank: Accession Nr. Y00490) in E. coli K12 MG1655 wurden PCR-Primer synthetisiert (MWG Biotech (Ebersberg, Deutschland)). Ein ca. 1,6 kbp großes DNA-Fragment konnte mit diesen Primern unter der Standard-PCR-Methode aus chromosomaler E. coli K12 MG1655 DNA amplifiziert werden. Die Größe wurde durch gelelektrophoretische Auf trennung (30 Minuten, 10V/cm) in einem 0,8 %igen Agarosegel bestimmt.

[0060] PCR-Primer für das avtA-Gen aus E. coli:

avtA1 5'-TGCTCTCTCAACGCCGAA -3'

50 avtA2 5'-GAAGCCGCCAACCGAGGATAA -3'

[0061] Das PCR-Produkt des avtA-Gens wurde in das Plasmid pCR®2.1 und in den E. coli Stamm TOP10F' transformiert (Invitrogen (Leek, Niederlande)). Der Klonierungserfolg wurde durch Spaltung der DNA des Plasmids pCR®2.1avtA mit den Restriktionsenzymen EcoRI und SmaI nachgewiesen. Dazu wurde die Plasmid DNA mittels des QIAprep Spin Plasmid Kits isoliert und nach Spaltung in einem 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm). In die SmaI-Schnittstelle des Plasmids pCR®2.1avtA wurde ein aadB-Gen kloniert und das erhaltene Plasmid mit pFE23 bezeichnet. Das aadB-Gen wurde dazu aus einem Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) isoliert, in welchen ein SmaI-Restriktionsansatz des Plasmids pHp45Ω (EMBL-GenBank: Accession Nr. K02163) aufgetrennt wurde. Liga-

EP 1 001 027 A2

tion erfolgte mit T4-DNA-Ligase. Nach Elektroporation des Ligationsansatzes in den Stamm DH5 α mcr wurden die Transformanten auf PA-Agar, welcher mit 20 μ g/ml Streptomycin (Sigma (Deisenhofen, Deutschland), Code no. S6501) versetzt war, selektioniert. DNA aus Streptomycin resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer EcoRI- und SphI-Spaltung und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) verifiziert.

[0062] Das avtA::aadB-Fragment wurde aus dem Plasmid pFE23 mittels EcoRI-Restriktion gespalten, im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) aufgetrennt und mit dem GLASSMAX™ Kit isoliert. Das Fragment wurde mit dem partiell EcoRI gespaltenem Plasmid pMAK705 mittels T4-DNA-Ligase ligiert, der Ligationsansatz in den Stamm DH5 α mcr elektroporiert und Transformanten durch Inkubation auf LB-Agar + 20 μ g/ml Streptomycin + 25 μ g/ml Chloramphenicol für 24 Stunden bei 30°C selektioniert. DNA aus Streptomycin und Chloramphenicol resistenten Kolonien wurde mit dem QIAprep Spin Plasmid Kit isoliert und der Erfolg der Klonierung mittels einer SphI- und EcoRI-Spaltung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) nachgewiesen. Das konstruierte Plasmid wurde mit pFE24 bezeichnet.

[0063] Mit Hilfe des Plasmids pFE24 wurde in dem Stamm E. coli K12 MG1655 das chromosomal avtA-Gen gegen das avtA::aadB-Allel ausgetauscht. Für den Genaustausch wurde eine modifizierte Methode nach Hamilton et al. verwendet. Das Plasmid pFE24 wurde in den E. coli K12 MG1655 Stamm elektroporiert, anschließend wurden die Transformanten zur Selektion auf Cointegrate auf LB-Chloramphenicol-Agar bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Die erhaltenen Kolonien wurden zur Vereinzelung wiederum auf dem gleichen Medium ausgestrichen und bei 42°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Desintegration des Plasmids wurden Einzelkolonien in 5ml LB-Flüssigmedium bei 42°C für 24 Stunden inkubiert, und anschließend eine Verdünnungsreihe des Flüssigmediums auf LB-Chloramphenicol-Agar ausplattiert. Diese Verdünnungsreihe wurde bei 30°C für 24 Stunden inkubiert. Zur Kurierung vom Plasmid wurden aus der Verdünnungsreihe erhaltene Einzelkolonien in 3 aufeinanderfolgenden Einzelkolonieausstrichen auf LB-Agar bei 42°C für jeweils 24 Stunden angezogen. Zur Kontrolle des Phänotyps wurden die erhaltenen Einzelkolonien parallel auf Agarplatten mit LB-Medium + 20 μ g/ml Streptomycin und LB-Medium + 25 μ g/ml Chloramphenicol angeimpft. Diese Medien wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. Unter 250 getesteten Einzelkolonien befand sich eine deren Phänotyp den Austausch des chromosomalen avtA-Gens durch das avtA::aadB-Fragment anzeigen. Dieser Stamm wurde mit FE7 bezeichnet.

[0064] Das Plasmid pFE80 wurde in den Stamm FE7 elektroporiert und Transformanten auf LB-Agar, welcher mit 100 μ g/ml Ampicillin versetzt war, und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C selektioniert. Der erhaltene Stamm wurde als FE7/pFE80 bezeichnet.

30 Beispiel 8

Bestimmung der Ketopantoatreduktase-Aktivität in verschiedenen Stämmen von Escherichia coli K12

[0065] Die spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität wurde nach der bei Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt. Hierzu wurden, mittels eines Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Deutschland) und des RiboLyser Kit Blue, Zellextrakte der einzelnen Stämme gewonnen. Die Ketopantoatreduktase Aktivität der Extrakte wurde anhand des NADPH Verbrauchs bei Zugabe von Ketopantoat bestimmt. Für den Stamm E. coli K12 MG1655 wurde eine spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität von 6,5 mU/mg, für den Stamm E. coli K12 MG1655/pFE65 eine von 22,0 mU/mg bestimmt. Im Falle von Stamm FE5 war keine Aktivität messbar.

Beispiel 9

Bildung von Pantothensäure durch verschiedene Stämme von Escherichia coli K12

[0066] Die Bildung von Pantothensäure durch die Stämme MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65, MG1655/pFE80, FE6/pFE80 und FE7/pFE80 wurde in batch - Kultur geprüft. Als Kulturmöglichkeit wurde das von Vogel (Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) beschriebene Medium E mit Glucose (0,4%) als Kohlenstoffquelle verwendet. Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tabelle 2 dargestellt.

50

Tabelle 2

Verbindung	Konzentration
MnSO ₄ · 7H ₂ O	0,2 g/l
Zitronensäure-Monohydrat	2,0 g/l

EP 1 001 027 A2

Tabelle 2 (fortgesetzt)

Verbindung	Konzentration
K_2HPO_4	10,0 g/l
$NaNH_4HPO_4 \cdot H_2O$	3,5 g/l

[0067] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 25 ml des angegebenen Nährmediums befüllt und der Ansatz beimpft. Nach einer Bebrütungszeit von 48 Stunden bei 37°C wurden die optische Dichte und die Pantothenat-Konzentration bestimmt. Für die Bestimmung der Zeldichte wurde die optischen Dichte mit einem Novaspec II Photometer-Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm eingesetzt. Der Pantothenat-Gehalt wurde im steril filtriertem Kulturüberstand bestimmt. Die Pantothenatbestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 3 zusammengefasst.

15

Tabelle 3

Stamm	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Zeldichte [oD_{580}]	Produktivität [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{oD}_{580}$]
MG1655	0,51	2,8	0,18
MG1655/pFE32	1,7	2,8	0,60
MG1655/pFE65	4,6	2,9	1,6
M61655/pFE80	14,0	2,9	4,8
FE6/pFE80	35,7	3,2	11,2
FE7/pFE80	41,7	3,0	13,9

30

Beispiel 10

Bildung von Pantothenat durch verschiedene Stämme von *Escherichia coli* K12 in Gegenwart von Ketopantoat

[0068] Die Bildung von Pantothenat durch die Stämme MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65 bei zugesetztem Ketopantoat wurde in batch - Kultur geprüft. Hierzu wurde das in Beispiel 8 beschriebene Medium mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Ketopantoat supplementiert. Die übrigen Versuchsbedingungen sind wie in Beispiel 8 angegeben. Das Ergebnis ist in Tabelle 4 zusammengefasst.

40

Tabelle 4

Stamm	Konzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Zeldichte [oD_{580}]	Produktivität [$\mu\text{g}/\text{ml}/\text{oD}_{580}$]
MG1655	6,2	2,9	2,1
MG1655/pFE32	9,0	2,9	3,1
MG1655/pFE65	12,6	2,9	4,3

50 Beispiel 11

Isolierung des *ilvC*-Gens von *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

[0069] Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* ATCC 13032 wurde wie bei Tauch et al. (Plasmid, 33:168-179, 1995) beschrieben, isoliert und mit der Restriktionsenzym Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung Sau3A, Code no. 27-0913-02) partiell gespalten. DNA-Fragmente in einem Größenbereich von 7-9 kb wurden mit Hilfe des "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey und Nagel, Düren, Deutschland; Cat. No. 740584) isoliert und in die dephosphorylierte BamHI-Schnittstelle des Vektors pUC19 (Viera et al., 1982, Gene,

19:259-268; MBI Fermentas, Litauen) ligiert. Die Ligation wurde wie von Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A laboratory Manual, Cold Spring Harbor) beschrieben durchgeführt, wobei das DNA-Gemisch mit T4-Ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Deutschland) über Nacht inkubiert wurde. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend in den E. coli Stamm DH5aMCR (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 87:4645-4649) elektroporiert (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348) und auf LB-Agar (Lennox, 1955, Virology, 1:190) + 100 µg/ml Ampicillin ausplattiert. Nach Inkubation für 24 h bei 37°C konnte die C. glutamicum Genbank durch Reisierung der Plasmid-DNA nach der "Alkalischen-Lyse-Methode" von Birnboim und Doly (1997, Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523) aus den Transformanden gewonnen werden. Mit dieser Genbank wurden kompetente Zellen des E. coli Stammes FE5, welcher Mutationen im panE und ilvC Gen trägt, elektroporiert. Der Elektroporationsansatz wurde im Anschluß an die Regenerationsphase (Tauch et.al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-347) zweimal mit Medium E (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218:97-106) gewaschen. Die Selektion der Transformanten erfolgte durch Ausplattieren auf Medium E-Agar + Glucose (0,4%) + 100 µg/ml Ampicillin + 50 µg/ml Isoleucin + 50 µg/ml Ketoisovalerat. Aus 4 erhaltenen Kolonien wurde mit Hilfe des QIAprep Spin Plasmid Kits die Plasmid DNA isoliert. Durch eine XbaI-Spaltung der Plasmid DNA und anschließender Auftrennung im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm) wurde gezeigt, daß es sich bei den Plasmiden um pUC19 Vektoren mit ca. 6,5 kbp großen Inserts handelte. Die Sequenzierung der Inserts mit anschließenden Homologievergleichen mit Hilfe des BLAST-Programms (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410) ergab, daß die Inserts in allen Fällen ein vollständiges ilvC-Gen aus C. glutamicum enthielten (EMBL-GenBank: Accession Nr. L09232). Eines dieser Plasmide wurde mit pFE90 bezeichnet.

20

Beispiel 12

Expression des ilvC-Gens von Corynebacterium glutamicum ATCC13032 in Corynebacterium glutamicum ATCC13032

25 [0070] Zur Expression des ilvC-Gens aus C. glutamicum in C. glutamicum ATCC13032, wurde das Plasmid pECm3 verwendet. Das Plasmid pECm3 ist ein Derivat des Plasmids pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123:343-348), dessen Kanamycin-Resistenzgen durch eine BglII- (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung BglII, Code no. 27-0946-02) und BamHI-Restriktionskarenz mit anschließender Religation entfernt wurde. Die Plasmide pECm2 sowie pECm3 sind in der Lage, sowohl in E. coli als auch in C. glutamicum zu replizieren. Zur Isolation des ilvC-Gens aus dem Plasmid pFE90 (Beispiel 11) wurde die isolierte Plasmid DNA mit dem Enzym XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland), Produktbeschreibung XbaI, Code no. 27-0948-01) gespalten, der Spaltungsansatz im 0,8 %igen Agarosegel aufgetrennt (30 Minuten, 10V/cm) und das 6,5 kbp ilvC-Fragment mit Hilfe des GLASSMAX™ Kits isoliert. Das isolierte ilvC-Fragment wurde mit dem ebenfalls XbaI gespaltenen Plasmid pECm3 mittels T4 DNA Ligase ligiert und der E. coli Stamm FE5 mit dem Ligationsansatz elektroporiert. Die Selektion auf Plasmid tragende Zellen erfolgte durch Ausplattieren des Elektroporationsansatzes auf LB Agar, welcher mit 50 µg/ml Chloramphenicol versetzt war und anschließender Inkubation für 24 Stunden bei 37°C. Das gesuchte Plasmid konnte nach DNA-Isolation und Kontrollspaltung, bei anschließender Gelelektrophorese im 0,8 %igen Agarosegel (30 Minuten, 10V/cm), mit dem Enzym XbaI in einem Klon identifiziert werden und wurde mit pFE91 bezeichnet.
 30 [0071] Das Plasmid pFE91 wurde in den Stamm C. glutamicum ATCC13032 elektroporiert und Transformanten auf LB Agar, welcher mit 7,5 µg/ml Chloramphenicol versetzt war, und anschließender Inkubation für 48 Stunden bei 30°C selektiert. Der erhaltene Stamm wurde als C. glutamicum ATCC13032/pFE91 bezeichnet.

35

Beispiel 13

40 45 Bildung von Pantothenat durch Corynebacterium glutamicum ATCC13032

[0072] Die Bildung von Pantothenat durch den C. glutamicum Stamm ATCC13032/pFE91 wurde in Medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175:5595-5603) mit 10 mg/ml Chloramphenicol, im Folgenden als C. glutamicum-Testmedium bezeichnet, geprüft. Dieses Medium ist in Tabelle 5 dargestellt. Je 50 ml frisch angesetztes C. glutamicum-Testmedium wurden mit einer 16 Stunden alten Kultur (C. glutamicum-Testmedium, 30°C, 150 Upm) mit einer o.D.₅₈₀ von 0,1 angeimpft. Nach 48stündiger Inkubation bei 30°C und 150 U/min wurden die Zellen durch 10minütige Zentrifugation bei 5000 x g entfernt, der Überstand wurde sterilfiltriert und die Pantothenat-Konzentration bestimmt. Die Zeldichte wurde wie in Beispiel 9 beschrieben bestimmt.
 50 [0073] Die Pantothenatbestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes Lactobacillus plantarum ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA, 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 6 dargestellt.

EP 1 001 027 A2

Tabelle 5

Substanz	Menge pro Liter	Bemerkung
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
Harnstoff	5 g	
KH ₂ KO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0.25 g	
MOPS	42 g	
CaCl ₂	10 mg	
FeSO ₄ * 7 H ₂ O	10 mg	
MnSO ₄ * H ₂ O	10 mg	
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	1 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	
NiCl ₂ * 6 H ₂ O	0.02 mg	
Biotin-	0.5 mg	
Glukose	40 g	separat autoklavieren
Protocatechusäure	0.03 mg	sterilfiltrieren

Tabelle 6

Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD ₅₈₀]	Produktivität [µg/ml/oD ₅₈₀]
ATCC13032	0,2	20	0,010
ATCC13032/pFE91	0,3	20	0,015

Beispiel 14:

Expression des panE-Gens von *Saccharomyces cerevisiae*

1. Amplifikation des Leserasters YHR063c:

[0074] Ausgehend von der Nukleotidsequenz des *Saccharomyces cerevisiae* Leserasters YHR063c (Accession Nr. U00061 des National Center for Biotechnology, Bethesda, MD, USA) wurden die nachstehenden PCR-Primer synthetisiert (MWG-Biotech, Ebersberg, Deutschland). Anfang bzw. Ende des Leserasters sind durch einen Punkt (.) gekennzeichnet:

- oJD539 (5' EcoRI-NotI START):
5'- GCG CGA ATT CAG ATC CGC GGC CGC AAA GAG GAG AAA TTA ACT ATG ACT GCA CCA CAC AGA AG -3'
- oJD540 (3' Sph-I-PstI STOP):
5'- CGC GAC TAG TCT GCA G TC AGT CCT TTC TCC AGT CAC -3'

[0075] Als Template diente genomische DNA des *S. cerevisiae* Stammes JD242, die nach der Methode von C.

EP 1 001 027 A2

Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics and molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991) isoliert wurde. Dieser Stamm ist eine haploide Segregante des diploiden Stammes SC288C (Winston et al., Yeast 11, 53ff. (1995)), dessen Genom sequenziert wurde (Goffeau et al., Science 274, pp. 546, (1996)). Die Tetradeanalyse erfolgte nach der Methode von C. Guthrie und G.R. Fink (Guide to yeast genetics 5 ans molecular biology, Methods in Enzymology, Vol. 194, Academic Press, San Diego, CA, 1991). Der Stamm JD242 ist auxotroph für Leucin (leu2Δ1 Allel) und Uracil (ura3-52 Allel). Ein etwa 1,2 kB großes DNA-Fragment konnte unter Verwendung des „High Fidelity Expand Polymerase“ Kits der Firma Roche (Mannheim) durch 28 PCR-Zyklen unter den vom Hersteller angegebenen Bedingungen amplifiziert werden. Die Größe wurde durch elektrophoretische Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel bestimmt.

10

2. Konstruktion von pJD-YHR063c:

[0076] Zur Expression des YHR063c Leserasters in *S. cerevisiae* wurde das PCR-Amplifikat in den *E. coli* - *S. cerevisiae* Pendelvektor pJDCEX2 eingebaut (Abbildung 8 und Dohmen et al., 1995, Journal of Biological Chemistry 270, 15 18099-18109)

[0077] Das PCR-Produkt wurde zunächst mit EcoRI und SpeI (AGS, Heidelberg, Deutschland) restriktiert. Anschließend wurde es mit pJDCEX2-DNA, welche mit EcoRI und XbaI (AGS, Heidelberg, Deutschland) behandelt worden war, gemischt und mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Bullock et al., 1987, Biotechniques 5, 376) transformiert. Tranformanten wurde durch Selektion auf LB-Agar, welcher 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) enthielt, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann durch Restriktion mit NotI und PstI und anschließender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel untersucht. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen pJD-YHR063c (Abbildung 9). Die Sequenz des in pJD-YHR063c kodierten PCR-Produktes wurde durch Sequenzierung mit den Oligonukleotiden oJD105 und oJD106 verifiziert.

25

- oJD105 (T-CYC1):
5'- GAAGTCATCGAAATAG-3'
- oJD106 (P-CUP1):
5'- TCGTTTCTGTCTTTTC-3'

30

3. Konstruktion von pKK-YHR063c:

[0078] Zur Expression des YHR063c-Leserasters in *E. coli* wurde das Plasmid pKK223-3 (Brosius and Holz, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)) verwendet. Hierzu wurde das Plasmid pJD-YHR063c zunächst mit EcoRI und PstI (AGS, Heidelberg, Deutschland) restriktiert. Das etwa 1,2 kB große YHR063c-Fragment wurde nach elektrophoretischer Auftrennung in einem 0,8%igen Agarosegel aus diesem ausgeschnitten und die DNA mit dem QiaexII Gel Extraction Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) isoliert. Anschließend wurde sie in das Plasmid pKK223-3, welches mit EcoRI und PstI geöffnet worden war, mit T4-DNA Ligase (Roche, Mannheim, Deutschland) ligiert. Der Ligationsansatz wurde in den *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, LaJolla, CA, USA) transformiert. Tranformanten wurde durch Selektion auf LB-Medium, welches 150 µg/ml Ampicillin (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) enthielt, erhalten. Die Plasmid-DNA aus den Ampicillin resistenten Klonen wurde durch alkalische Lyse präpariert (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Der Klonierungserfolg wurde durch Restriktion mit EcoRI und PstI und anschließender Auftrennung im 0,8%igen Agarosegel überprüft. Das Plasmid mit der gewünschten Struktur erhielt den Namen pKK-YHR063c.

45

Beispiel 15:

Komplementation der *E. coli* Mutante FE5

50

[0079] Zur Analyse der panE-Funktion des YHR063c Leserasters aus *S. cerevisiae* wurde untersucht, ob die Expression dieses Leserasters die Pantothensäure-Bedürftigkeit des *E. coli* Stammes FE5 (Beispiel 1) komplementieren kann. Dieser Stamm ist in den Genloci panE und ilvC mutiert. Hierzu wurde zunächst der Stamm FE5 mit Plasmid pKK-YHR063c transformiert.

55

[0080] Anschließend wurde das Wachstum des Stammes FE5/pKK-YHR063c auf M9-Minimalagar (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989), der mit 50 µg/ml Ketoisovalerat (Kiv) und 50 µg/ml Isoleucin (Ile) supplementiert worden war, in Abhängigkeit von der Zugabe von Pantothenat (50 µg/ml) untersucht. Als negative Kontrolle diente der Stamm FE5/pKK223-3 und als positive Kontrolle der Stamm

EP 1 001 027 A2

FE4/pFE65 (Beispiel 4). Tabelle 7 zeigt das Ergebnis des Versuches: Das in Plasmid pKK-YHR063c enthaltene S. cerevisiae Leseraster YHR063c komplementiert die panE-ilvC Doppelmutation des E. coli Stammes FE5. Das Leseraster YHR063c hat die Funktion eines panE-Gens.

5

Tabelle 7

Stamm	M9 + Kiv + Ile mit Pantothenat	M9 + Kiv + Ile ohne Pantothenat
FE5/pFE65	Wachstum	Wachstum
FE5/pKK223-3	Wachstum	kein Wachstum
FE5/pKK-YHR063c	Wachstum	Wachstum

15 Beispiel 16

Bestimmung der Ketopantoatreduktase-Aktivität in verschiedenen Stämmen von *Saccharomyces cerevisiae*

[0081] Der *S. cerevisiae* Stamm JD242 (Siehe Beispiel 14) wurde mit den Plasmiden pJDCEX2 und pJD-YHR063c nach der Methode von Dohmen et al. transformiert (Dohmen et al., Yeast 7, 691(1991)). Die Selektion auf Transformanten erfolgte auf leucinfreiem Minimalmedium mit 1,8% Agar (siehe Tab. 8a,b).

[0082] Als Nährmedium wurde eine Pantotethensäure - freie Variante des im Difco-Manual (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)) beschriebenen Yeast Nitrogen Base-Minimalmediums (YNB) verwendet. Es enthält zusätzlich Glucose (2%), Uracil (40 µg/ml), CuSO₄ (150 µM) zur Induktion des P_{CUP1}-Promoters von pJDCEX2 und pJD-YHR-063c, -Leu Drop-Out Supplement der Firma CLONTECH (Heidelberg, Deutschland, Cat. no. 8605-1) (650 µg/ml) und die Supplamente Ketopantoat (100 µg/ml) und β-Alanin (100 µg/ml). Die Zusammensetzung des verwendeten Mediums ist in Tabelle 8a und b dargestellt.

30

Tabelle 8a

Verbindung	Menge pro Liter
(NH ₄) ₂ SO ₄	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	0,5 g
NaCl	0,1 g
CaCl ₂	0,1 g
H ₃ BO ₃	500 µg
CuSO ₄	40 µg
KI	100 µg
FeCl ₃ * 6 H ₂ O	200 µg
MnSO ₄ * H ₂ O	400 µg
Na ₂ MoO ₄ * 2 H ₂ O	400 µg
ZnSO ₄ * 7 H ₂ O	200 µg
Biotin	2 µg
Folsäure	2 µg
Inositol	2 mg
Niacin	400 µg
p-Aminobenzoësäure	200 µg
Pyridoxin Hydrochlorid	400 µg

EP 1 001 027 A2

Tabelle 8a (fortgesetzt)

Verbindung	Menge pro Liter
Riboflavin	200 µg
Thiamin Hydrochlorid	400 µg

5

10

Tabelle 8b

Zusätze	Menge pro Liter
Glucose	20 g
Uracil	40 mg
CuSO ₄	24 mg
-Leu DO Supplement	650 mg
Ketopantoat	100 mg
β-Alanin	100 mg

20

[0083] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 50 ml des angegebenen Nährmediums gefüllt, der Ansatz mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft (siehe Tab. 8a,b) und bei 30°C und 175 U/min 72 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml des gleichen Nährmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben so mit der Vorkultur beimpft, das die optischen Dichte (580 nm) 0,5 betrug. Nach einer 24 stündigen Bebrütungszeit bei 30°C und 175 U/min wurden die optische Dichte mit einem Novaspec II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm gemessen. Sie betrug für beide Kulturen 4,0. Die spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität der *S. cerevisiae* Stämme JD242/pJDCEX2 und JD242/pJD-YHR063c wurde nach der bei Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)) beschriebenen Methode bestimmt.

[0084] Hierzu wurden, mittels eines Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Deutschland) und des RiboLyser Kit Red, Zellextrakte der einzelnen Stämme gewonnen. Die Ketopantoatreduktase Aktivität der Extrakte wurde anhand des NADPH Verbrauchs bei Zugabe von Ketopantoat bestimmt. Der Proteingehalt wurde nach der Methode von Bradford ermittelt (Bradford, Analytical Biochemistry 72, 248ff.(1976)). Für den Kontrollstamm JD242/pJDCEX2 wurde eine spezifische Ketopantoatreduktase Aktivität von 3 mU/mg Protein und für der Stamm JD242/pJD-YHR063c eine spezifische Aktivität von 386 mU/mg Protein bestimmt.

25

Beispiel 17

40

Bildung von Pantothensäure durch verschiedene Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*

[0085] Die Bildung von Pantothensäure durch die Stämme *S. cerevisiae* JD242/pJDCEX2 und JD242/pJD-YHR063c wurde in batch - Kultur geprüft.

[0086] 250 ml Erlenmeyerkolben wurden mit 50 ml des in Tab. 8a,b angegebenen Nährmediums gefüllt, der Ansatz mit Hilfe einer Impföse mit einer Einzelkolonie von einer Agarplatte beimpft (siehe Tabelle 8a,b) und bei 30°C und 175 U/min 72 Stunden inkubiert. Mit dieser Vorkultur wurden 50 ml des gleichen Nährmedium in einem 250 ml Erlenmeyerkolben so mit der Vorkultur beimpft, das die optischen Dichte (580 nm) 0,5 betrug. Nach einer 24 stündigen Bebrütungszeit bei 30°C und 175 U/min wurden die optische Dichte (580 nm) und die Pantothensäure-Konzentration bestimmt. Für die Bestimmung der Zelldichte wurde die optischen Dichte mit einem Novaspec II Photometer der Firma Pharmacia (Freiburg, Deutschland) bei einer Meßwellenlänge von 580 nm gemessen. Der Pantothensäure-Gehalt wurde im steril filtrierten Kulturerstand bestimmt.

[0087] Die Pantothensäurebestimmung (als Calciumsalz) erfolgte mit Hilfe des Stammes *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 nach Angaben des Handbuchs "DIFCO MANUAL" der Firma DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). Das Ergebnis ist in Tabelle 9 zusammengefasst.

EP 1 001 027 A2

Tabelle 9

S. cerevisiae Stamm	Konzentration [µg/ml]	Zelldichte [oD_{580}]	Produktivität [µg/ml/ oD_{580}]
JD242/pJDCEX2	0,93	4,0	0,023
JD242/pJD-YHR063c	1,12	4,1	0,027

Abbildungen

Folgende Abbildungen sind beigefügt:

[0088]

- Abbildung 1: Karte des Plasmids pDB1
- Abbildung 2: Karte des Plasmids pGAD10
- Abbildung 3: Karte des Plasmids pFEBank16
- Abbildung 4: Karte des Plasmids pFE32
- Abbildung 5: Karte des Plasmids pFE65
- Abbildung 6: Karte des Plasmids pFE80
- Abbildung 7: Karte des Plasmids pFE91
- Abb.8: Karte des Plasmids pJDCEX2.
- Abb.9: Karte des Plasmids pJD-YHR063c.

[0089] Bei der Angabe der Basenpaarzahlen handelt es sich um ca.-Werte, die im Rahmen der Reproduzierbarkeit erhalten werden.

[0090] Die in den Abbildungen verwendeten Abkürzungen haben folgende Bedeutung:

rrnBT1T2: Transkriptions-Terminator des rrnB-Gens

Ptac: tac Promotor

P AHD1: Promotor des ADH1 Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*

T ADH1: Terminator des ADH1 Gens aus *Saccharomyces cerevisiae*

repts: thermosensitiver Replikationsursprung

ilvC: Kodierbereich des ilvC Gens

ilvC': 5'-Bereich des ilvC Gens

ilvC: 3'-Bereich des ilvC Gens

panB: Kodierbereich des panB Gens

panC: Kodierbereich des panC Gens

EP 1 001 027 A2

	panD:	Kodierbereich des panD Gens
	panE:	Kodierbereich des panE Gens
5	Amp:	Resistenzgen für Ampicillin
	tet':	5'-Bereich des tet Gens
	'tet:	3'-Bereich des tet Gens
10	Cm:	Resistenzgen für Chloramphenicol
	Gm:	Resistenzgen für Gentamycin
15	Gal4:	Regulator für Galactose induzierbare Gene aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	bps:	Basenpaare
	LEU2:	Beta-Isopropylmalat Dehydrogenase-Gen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
20	2 μ :	Sequenzen des endogenen 2 μ Plasmides von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	Ap ^R :	Beta-Lactamase-Gen
25	P-CUP1:	Promoter des <i>Saccharomyces cerevisiae</i> CUP1-Gens (Metallothionein)
	T-CYC1:	Terminator des CYC1-Gens (Cytochrom C) von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>
	ORF:	open reading frame
30	SD:	Shine-Dalgarno Sequenz
	EcoRI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRI
35	EcoRV:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms EcoRV
	HincII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HincII
	HindIII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms HindIII
40	KpnI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms KpnI
	Sall:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms Sall
45	SmaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SmaI
	SphI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SphI
	PvuII:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PvuII
50	NotI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms NotI aus <i>Nocardia otitidis-cavarium</i>
	SpeI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms SpeI aus <i>Shpaerotilus spec.</i>
55	XbaI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms XbaI aus <i>Xanthomonas badrii</i>
	PstI:	Schnittstelle des Restriktionsenzyms PstI aus <i>Providencia stuartii</i>

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung und Verbesserung Pantothenäsäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärkung, insbesondere Überexpression für die Ketopantoatreduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens.
5
2. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression die Kopienzahl der Gene bzw. Nukleotidsequenzen in den Mikroorganismen durch die Insertion von diese Gene bzw. Nukleotidsequenzen tragenden Plasmidvektoren erhöht.
10
3. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression die sich stromaufwärts des Strukturgens befindende Promoter- und Regulationsregion mutiert.
15
4. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Überexpression stromaufwärts des Strukturgens Expressionskassetten einbaut.
20
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 4,
dadurch gekennzeichnet,
daß man für die Ketopantoatreduktase codierende Nucleotidsequenzen in Mikroorganismen verstärkt insbesondere überexprimiert, die eine oder mehrere Metabolit- und/oder Antimetabolit-Resistenzmutationen aufweisen.
25
6. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zur Erzielung der Verstärkung oder Überexpression das Kulturmedium und/oder die Fermentationsführung ändert.
30
7. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß man die Stoffwechselwege in den Mikroorganismen ausschaltet, die die Pantothenat-(Pantothenäsäure)bildung verringern.
35
8. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das avtA-Gen ausschaltet.
40
9. Verfahren gemäß Anspruch 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das ilvE-Gen ausschaltet.
45
10. Verfahren gemäß Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß man das ilvC-Gen von C. glutamicum in Mikroorganismen, insbesondere der Gattungen Corynebakterien oder E. coli überexprimiert oder verstärkt.
50
11. Verfahren gemäß den Ansprüchen 1 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß man zusätzlich zu den für die Ketopantoatreduktase codierenden Nucleotidsequenzen eines oder mehrere der Gene des Stoffwechselweges der Pantothenäsäurebildung verstärkt, insbesondere überexprimiert.
55
12. Verfahren gemäß Anspruch 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man eines oder mehrere der Gene, die für Enzyme Ketopantoat-Hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), Aspartat-1-Decarboxylase (EC 4.1.1.11) und Pantothenat-Synthetase (EC 6.3.2.1) kodieren, zusätzlich verstärkt, insbesondere überexprimiert.

13. Verfahren gemäß den Ansprüchen 11 und 12,
dadurch gekennzeichnet,
daß man verschiedene kompatible Plasmidvektoren einsetzt, die die genannten Gene enthalten.
- 5 14. Verfahren gemäß den Ansprüchen 10 und 11,
dadurch gekennzeichnet,
daß man einen mit einem oder mehreren miteinander kompatiblen Plasmidvektor(en) transformierten Stamm ein-setzt, und der Plasmidvektor eines oder mehrere der genannten Gene einschließlich des panE-Gens trägt, in dem
10 die Gene nacheinander angeordnet und unter die Kontrolle eines gemeinsamen Promotors oder getrennt vonein-ander angeordnet unter die Kontrolle verschiedener Promotoren gestellt werden.
- 15 15. Plasmidvektor pFE80,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 6 wiedergegebene Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG 1655/pFE80 unter der
Bezeichnung DSM 12414.
- 20 16. Plasmidvektor pFE65,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 5 wiedergegebene Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG1655/pFE65 unter der
Bezeichnung DSM 12382.
- 25 17. Plasmidvektor pFE32,
gekennzeichnet durch
die in Abbildung 4 wiedergegebene Restriktionskarte und hinterlegt in E.coli K12 Stamm MG1655/pFE32 der
Bezeichnung DSM 12413.
- 30 18. E.coli K12 Stamm FE6, der eine Valin-Resistenz trägt.
19. E.coli K12 Stamm FE7, in dem das avtA-Gen gegen ein avtA::aadB-Fragment ausgetauscht ist, hinterlegt unter der
Bezeichnung DSM 12380.
- 35 20. Ein Mikroorganismus (Wirtszelle) der Gattung E.coli oder Corynebacterium, das eines der Plasmidvektoren gemäß
den Ansprüchen 11 bis 14 und gegebenenfalls eine oder mehrere Metabolit und/oder Antimetabolit-Resistenz ent-hält.
21. C.glutamicum ATCC 13032/pFE91, das den Plasmidvektor pFE91 mit dem ilvC-Gen von C.glutamicum enthält.
- 40 22. Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure,
dadurch gekennzeichnet,
daß man folgende Schritte durchführt:
 - a) Fermentation von Mikroorganismen gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüchen,
 - b) Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen,
 - c) Isolieren der Pantothensäure.
- 45 23. Verfahren gemäß Anspruch 22,
dadurch gekennzeichnet,
daß man als Vorstufe Ketopantoat zusetzt.
- 50 24. Verfahren gemäß Anspruch 23,
dadurch charakterisiert,
daß man in Stufe a) eine Vorstufe der Pantothensäure zusetzt, ausgewählt aus der Gruppe β-Alanin oder Ketoiso-valerat.
- 55 25. Verfahren gemäß einem oder mehreren der vorhergehenden Ansprüche,
dadurch gekennzeichnet,
daß man Mikroorganismen der Gattung E.coli oder Corynebacterium oder Hefe einsetzt.

Abb. 1

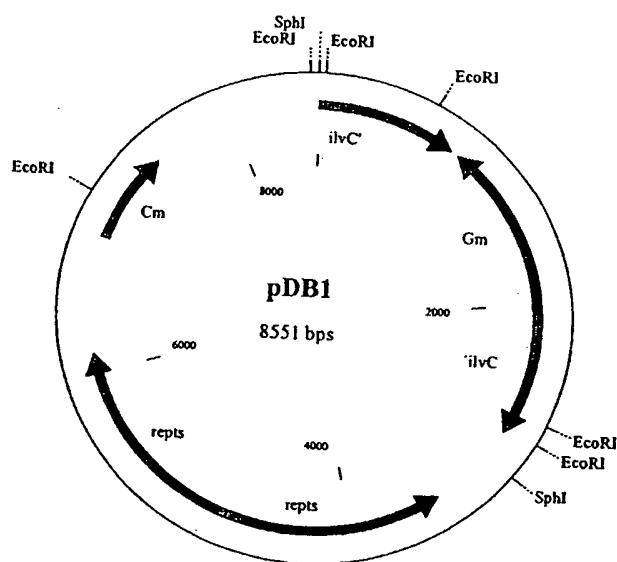


Abb. 2

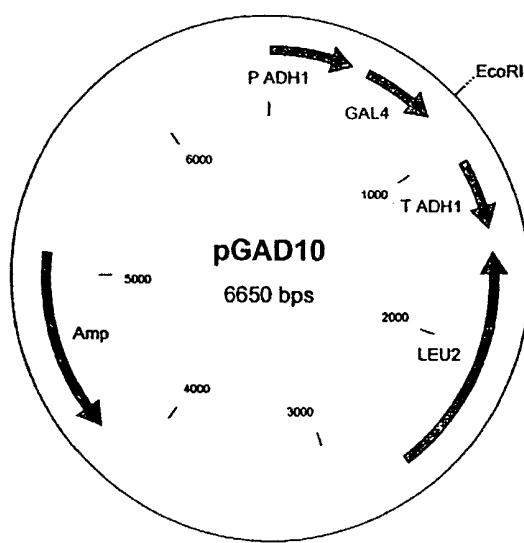


Abb. 3

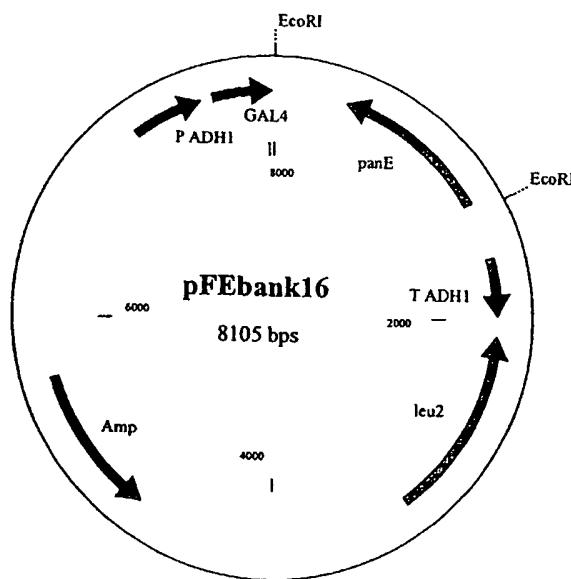


Abb. 4

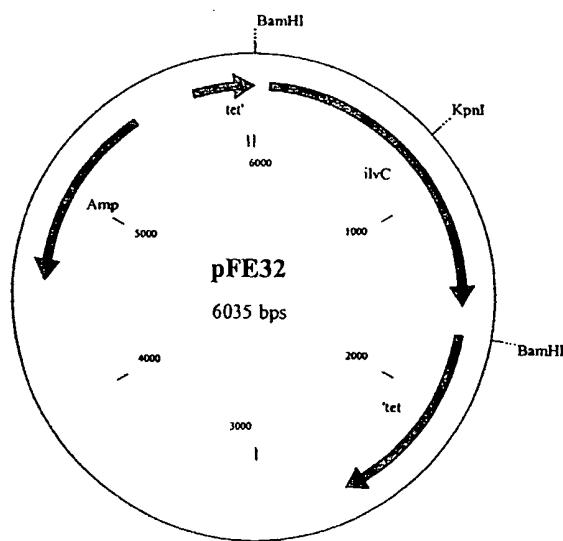


Abb. 5

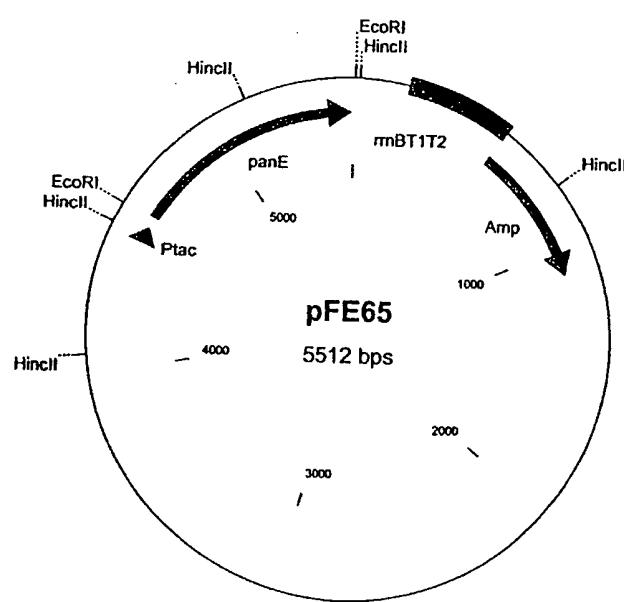


Abb. 6

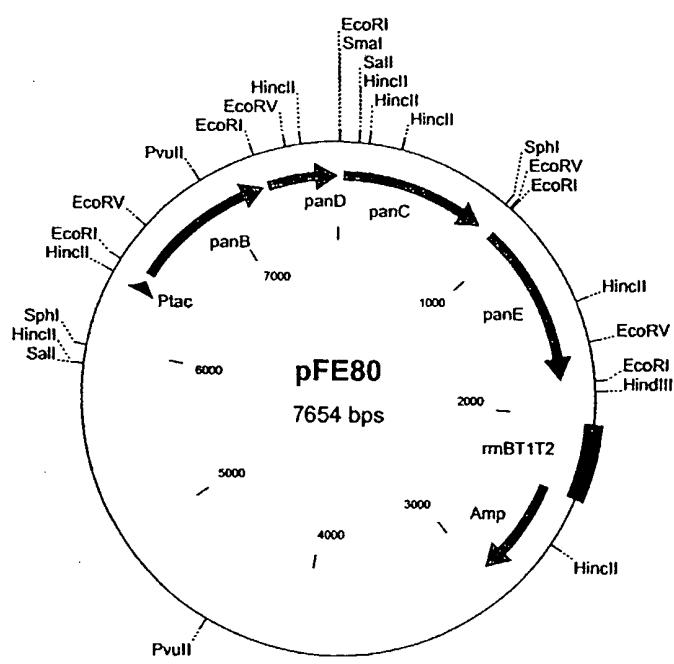
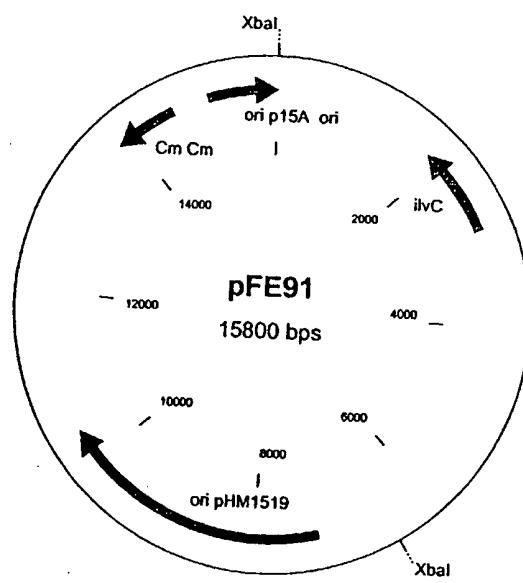
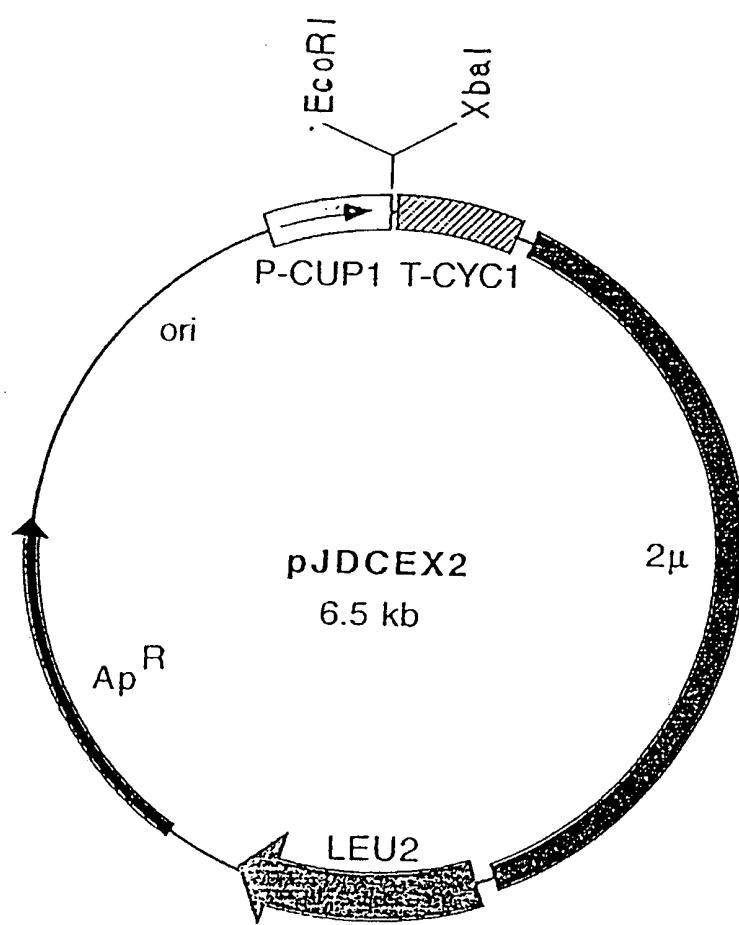
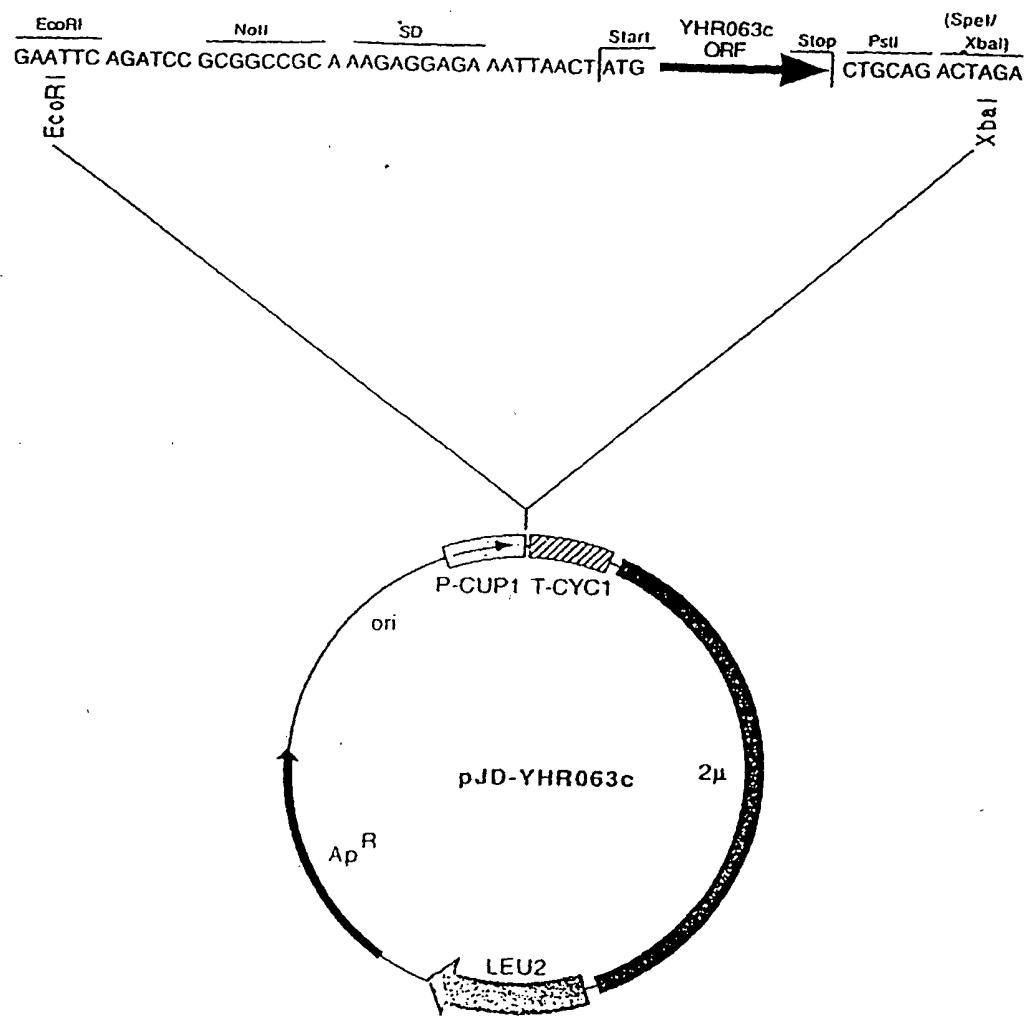
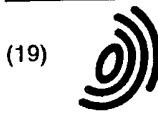


Abb. 7









(19)

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11)

EP 1 001 027 A3

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(88) Veröffentlichungstag A3:
16.08.2001 Patentblatt 2001/33

(51) Int Cl.7: C12N 15/53, C12N 15/67,
C12N 15/70, C12N 1/21,
C12P 13/02, C12P 7/42

(43) Veröffentlichungstag A2:
17.05.2000 Patentblatt 2000/20

(21) Anmeldenummer: 99118670.1

(22) Anmeldetag: 22.09.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

(30) Priorität: 09.10.1998 DE 19846499

(71) Anmelder: Degussa AG
40474 Düsseldorf (DE)

(72) Erfinder:
• Elischewski, Frank, Dr.
33818 Leopoldshöhe (DE)

- Kalinowski, Jörn, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)
- Dusch, Nikole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Dohmen, Jürgen, Dr.
40760 Meerbusch (DE)
- Farwick, Mike, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(54) **Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Verstärkung von für Ketopantoat-Reduktase kodierende Nukleotidsequenzen**

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung D-Pantothensäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärken für die Ketopantoat-Reduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilVC-Gens,

die diese Nucleotidsequenzen enthaltende Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung D-Pantothensäure bestehend aus der Fermentation dieser Mikroorganismen, der Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und dem Isolieren der D-Pantothensäure.

EP 1 001 027 A3



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 8670

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE												
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrift Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)									
X	<p>DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1983 PRIMERANO D A ET AL: "ROLE OF ACETO HYDROXY ACID ISOMERO REDUCTASE IN BIOSYNTHESIS OF PANTOTHENIC-ACID IN SALMONELLA-TYPHIMURIUM" Database accession no. PREV198376072046 XP002170048 * Zusammenfassung * & JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Bd. 153, Nr. 1, 1983, Seiten 259-269, ISSN: 0021-9193</p> <p>—</p>	1-25	C12N15/53 C12N15/67 C12N15/70 C12N1/21 C12P13/02 C12P7/42									
A	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; BAIGORI, MARIO ET AL: "Isolation and characterization of <i>Bacillus subtilis</i> mutants blocked in th synthesis of pantothenic acid" retrieved from STN Database accession no. 115:86365 XP002170049 * Zusammenfassung * & J. BACTERIOL. (1991), 173(13), 4240-2 ,</p> <p>—</p> <p>—/—</p>	1-25	<p>RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)</p> <p>C12N C12P</p>									
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="width: 33%;">Recherchenort</td> <td style="width: 33%;">Abschlußdatum der Recherche</td> <td style="width: 34%;">Prüfer</td> </tr> <tr> <td>MÜNCHEN</td> <td>19. Juni 2001</td> <td>Douschan, K</td> </tr> <tr> <td colspan="2">KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE</td> <td>T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument</td> </tr> </table>				Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	MÜNCHEN	19. Juni 2001	Douschan, K	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument
Recherchenort	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer										
MÜNCHEN	19. Juni 2001	Douschan, K										
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE		T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument S : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument										



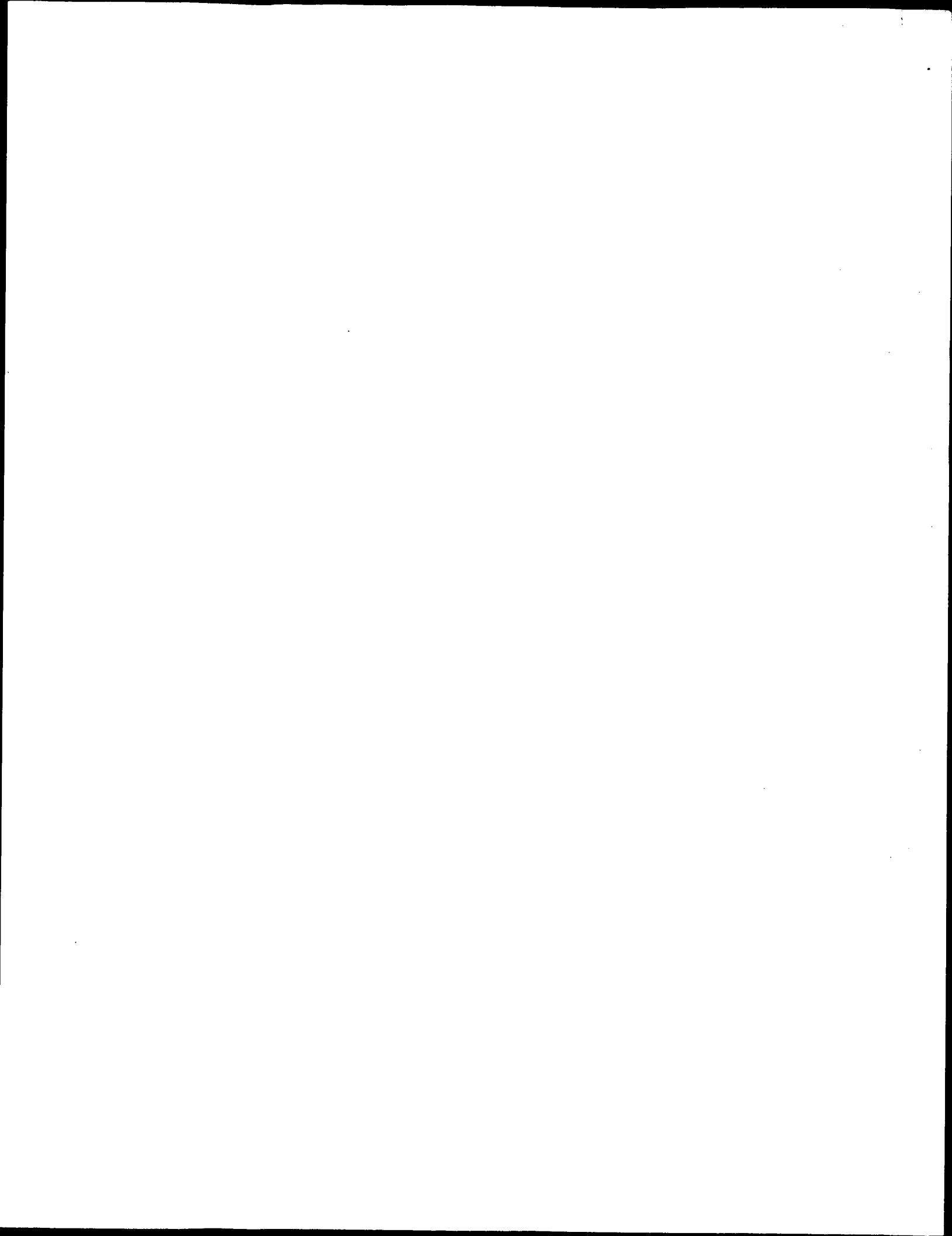
Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER RECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 99 11 8670

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE												
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betriefl Anspruch	KLAFFIKATION DER ANMELDUNG (Int.Cl.7)									
A	<p>DATABASE CHEMABS 'Online! CHEMICAL ABSTRACTS SERVICE, COLUMBUS, OHIO, US; SHIMIZU, SAKAYU ET AL: "Ketopantoic acid reductase of Pseudomonas maltophilia 845. Purification, characterization, and role in pantothenate biosynthesis" retrieved from STN Database accession no. 109:186033 XP002170050 * Zusammenfassung * & J. BIOL. CHEM. (1988), 263(24), 12077-84</p> <p>-----</p>	1-25										
			RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int.Cl.7)									
<p>Der vorliegende Recherchenbericht wurde für alle Patentansprüche erstellt</p> <table border="1"> <tr> <td>Recherchenort MÜNCHEN</td> <td>Abslußdatum der Recherche 19. Juni 2001</td> <td>Prüfer Douschan, K</td> </tr> <tr> <td colspan="3"> KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur </td> </tr> <tr> <td colspan="3"> T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument </td> </tr> </table>				Recherchenort MÜNCHEN	Abslußdatum der Recherche 19. Juni 2001	Prüfer Douschan, K	KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur			T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument		
Recherchenort MÜNCHEN	Abslußdatum der Recherche 19. Juni 2001	Prüfer Douschan, K										
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTE X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur												
T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument												





Europäisches Patentamt

(19)

European Patent Office

Office européen des brevets



(11)

EP 1 001 027 A2

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(43) Veröffentlichungstag:
17.05.2000 Patentblatt 2000/20

(51) Int. Cl.⁷: C12N 15/53, C12N 15/67,
C12N 15/70, C12N 1/21,
C12P 13/02, C12P 7/42

(21) Anmeldenummer: 99118670.1

(22) Anmeldetag: 22.09.1999

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH CY DE DK ES FI FR GB GR IE IT LI LU
MC NL PT SE
Benannte Erstreckungsstaaten:
AL LT LV MK RO SI

- Kalinowski, Jörm, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Pühler, Alfred, Prof. Dr.
33739 Bielefeld (DE)
- Dusch, Nikole, Dr.
33619 Bielefeld (DE)
- Dohmen, Jürgen, Dr.
40760 Meerbusch (DE)
- Farwick, Mike, Dr.
33615 Bielefeld (DE)
- Thierbach, Georg, Dr.
33613 Bielefeld (DE)

(30) Priorität: 09.10.1998 DE 19846499

(71) Anmelder:
Degussa-Hüls Aktiengesellschaft
60311 Frankfurt am Main (DE)

(72) Erfinder:
• Elischewski, Frank, Dr.
33818 Leopoldshöhe (DE)

(54) Verfahren zur Herstellung von Pantothensäure durch Verstärkung von Ketopantoat-Reduktase kodierende Nukleotidsequenzen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung und Verbesserung D-Pantothensäure produzierender Mikroorganismen durch Verstärken für die Ketopantoatreduktase codierender Nucleotidsequenzen, insbesondere des panE-Gens, einzeln oder kombiniert miteinander, und gegebenenfalls zusätzlich des ilvC-Gens, die diese Nucleotidsequenzen enthaltende Mikroorganismen und ein Verfahren zur Herstellung D-Pantothensäure bestehend aus der Fermentation dieser Mikroorganismen, der Anreicherung der Pantothensäure im Medium oder in den Zellen der Mikroorganismen und dem Isolieren der D-Pantothensäure.

EP 1 001 027 A2

A process for producing pantothenic acid by enhancement of nucleotide sequences coding for ketopantoate reductase

The invention relates to a process for producing and improving microorganisms which produce D-pantothenic acid by enhancement of nucleotide sequences coding for ketopantoate reductase, in particular of the panE gene, singly or combined together, and where appropriate additionally of the ilvC gene, to microorganisms containing these nucleotide sequences, and to a process for producing D-pantothenic acid, consisting of the fermentation of these microorganisms, the accumulation of pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms and the isolation of D-pantothenic acid.

Description

Prior art

Pantothenic acid is a commercially important vitamin which is used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition.

Pantothenic acid can be produced by chemical synthesis or biotechnologically by fermentation of suitable microorganisms in suitable nutrient solutions. In the chemical synthesis, DL-pantolactone is an important compound. It is prepared in a multistage process from formaldehyde, isobutyraldehyde and cyanide. In subsequent process steps there is fractionation of the racemic mixture and condensation of D-pantolactone with β -alanine to obtain D-pantothenic acid.

The advantage of production by fermentation of microorganisms is that there is direct formation of the required stereoisomeric D form.

Various species of bacteria such as, for example, *Escherichia coli*, *Arthrobacter ureafaciens*, *Corynebacterium erythrogenes*, *Brevibacterium ammoniagenes* and of yeasts such as, for example, *Debaromyces castelli* are able, as shown in EPA 0 493 060, to produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose, DL-pantoic acid and β -alanine. EPA 0 493 060 additionally shows that the formation of D-pantothenic acid is improved in *Escherichia coli* by amplification of pantothenic acid biosynthesis genes which are present on the plasmids pFV3 and pFV5 in a nutrient solution which contains glucose, DL-pantoic acid and β -alanine.

EPA 0 590 857 and US Patent 5,518,906 describe mutants derived from the *Escherichia coli* strain IFO3457, such as FV5714, FV525, FV814, FV521, FV221, FV6051 and FV5069, which are both resistant to various antimetabolites such as salicylic acid, α -ketobutyric acid, β -hydroxyaspartic acid, O-methylthreonine and α -ketoisovaleric acid and produce pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and produce D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and β -alanine. EPA 0 590 857 and US Patent 5,518,906 also show that after amplification of the pantothenic acid biosynthesis genes which are present on the plasmid pFV31 in the abovementioned strains there is improvement in the production of D-pantoic acid in a nutrient solution containing glucose and in the production of D-pantothenic acid in a nutrient solution containing glucose and β -alanine.

WO 97/10340 moreover shows that pantothenic acid production can be further increased in *Escherichia coli* strains which form pantothenic acid by increasing the activity of the enzyme acetohydroxy acid synthase II, an enzyme of valine biosynthesis.

Object of the invention

The inventors' object is to provide novel bases for an improved process for producing pantothenic acid.

Description of the invention

The vitamin pantothenic acid is a commercially important product used in cosmetics, medicine, human nutrition and livestock nutrition. There is thus a general interest in providing improved processes for producing pantothenic acid. Mentions of D-pantothenic acid or pantothenic acid or pantothenate in the following text mean not only the free acid but also the salts of D-pantothenic acid such as, for example, the calcium, sodium, ammonium or potassium salt.

The invention relates to a process for producing and improving pantothenic acid-producing microorganisms by enhancement, in particular overexpression, of nucleotide sequences coding for ketopanthoate reductase, in particular of the panE gene, singly or combined together, and, where appropriate, additionally of the ilvC gene.

The term "enhancement" in this connection described the elevation of the intracellular activity of one or more enzymes which are encoded by the appropriate DNA, by increasing the copy number of the gene(s), using a strong promoter, or using a gene which codes for an appropriate enzyme with a high specific activity and, where appropriate, combining these measures.

It has been found in particular that on overexpression of the panE gene together with the panB, panC and panD genes there is a further improvement in the formation of pantothenic acid. To achieve the overexpression it is possible to increase the copy number of the appropriate genes by means of plasmid vectors such as, for example, pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90) or pUC19 (Vicra, Gene 1982 19: 259-268), or the promoter and regulatory region located upstream of the structural gene can be mutated. A well-known example thereof is the lac-UV5 mutation of the lac promoter (Winnacker: Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990). Expression cassettes act in the same way, which method has been applied, for example, by LaVallie et al. (BIOTECHNOLOGY 11, 187-193 (1993) and PCT/US97/13359). An alternative possibility for achieving overexpression of the relevant genes is also by changing the medium composition and management of the culture. One example thereof is the universally known regulation of the expression of the lac operon by glucose and lactose. The inventors have additionally found that overexpression of the panE gene has advantageous effects in strains which have resistance mutations against metabolites and antimetabolites such as, for example, resistance to L-valine. It has

also been found that overexpression of the panE gene has advantageous effects in strains which have defect mutations in genes of metabolic pathways, such as, for example, the avtA or ilvE gene, which convert precursors of pantothenic acid or reduce pantothenic acid formation.

The microorganisms to which the present invention relates are able to produce pantothenic acid from glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch, cellulose or from glycerol and ethanol. These comprise fungi, yeasts or, in particular, Gram-positive bacteria, for example of the genus *Corynebacterium*, or Gram-negative bacteria such as, for example, those of the Enterobacteriaceae. In the family of Enterobacteriaceae, particular mention should be made of the genus *Escherichia* with the species *Escherichia coli*. Within the species *Escherichia coli*, mention should be made of the so-called K-12 strains such as, for example, the strains MG1655 or W3110 (Neidhard et al.: *Escherichia coli* and *Salmonella*. Cellular and Molecular Biology (ASM Press, Washington D.C.)) or the *Escherichia coli* wild-type strain IFO3547 (Institute for Fermentation, Osaka, Japan) and mutants derived therefrom. For the genus *Corynebacterium*, particular mention should be made of the species *Corynebacterium glutamicum*, which is well-known among those skilled in the art for its ability to form amino acids. This species includes wild-type strains such as, for example, *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, *Brevibacterium flavum* ATCC14067, *Corynebacterium melassecola* ATCC17965 and others.

To isolate the ilvC gene and the panE gene, initially a mutant harboring a mutation in the ilvC gene and panE gene is produced, for example from *Escherichia coli*.

The nucleotide sequence of the ilvC gene of *Escherichia coli* is known (Wek and Hatfield, Journal of Biological Chemistry 261, 2441-2450 (1986)). Methods for isolating chromosomal DNA are likewise known (Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). It is possible by choosing suitable primers to amplify the ilvC gene by means of the polymerase chain reaction (Innis et al., PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press). It is then inserted into a plasmid vector. Suitable plasmid vectors are those able to replicate in the appropriate microorganisms. Suitable for the present invention for *Escherichia coli* are, for example, the vectors pSC101 (Vocke and Bastia, Proceedings of the National Academy of Science USA, 80 (21), 6557-6561 (1983)) or pKK223-3 (Brosius and Holy, Proceedings of the National Academy of Science USA 81, 6929 (1984)), for *Corynebacterium glutamicum* are, for example, the vector pJC1 (Cremer et al., Mol. Gen. Genet. 220: 478-480 (1990)) or pEKE \times 2 (Eikmanns et al., Gene 102: 93-98 (1991)) or pZ8-1 (European Patent 0 375 889) and for *Saccharomyces cerevisiae*

are, for example, the vector pBB116 (Berse, Gene 25: 109-117 (1983)) or pDG1 (Buxton et al., Gene 37: 207-214 (1985)). Methods for incorporating DNA fragments into plasmid vectors are described in Sambrook et al.: Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Methods for Transformation and Electroporation are described by Tauch et al. (FEMS Microbiology Letters 123: 343-347 (1994)). An example of such a transformed strain is the *Escherichia coli* strain MG1655/pFE32. Plasmid pFE32 comprises the *ilvC* gene of MG1655 which has been incorporated into the vector pBR322. Another example of such a transformed strain is the *Corynebacterium glutamicum* strain ATCC13032/pFE91. Plasmid pFE91 comprises the *ilvC* gene of ATCC13032 which has been incorporated into the vector pECm3. The plasmid pECm3 is a derivative of the plasmid pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-348), whose kanamycin resistance gene has been deleted by a *Bgl*III and *Bam*HII restriction with subsequent religation.

To incorporate into the *ilvC* gene a mutation which switches off its functioning it is possible, for example, to incorporate a deletion or insertion into it. To generate a deletion is possible with the aid of suitable restriction enzymes and subsequent linkage of the resulting ends to delete an internal part of the nucleotide sequence of the structural gene. The *ilvC* gene mutated in this way is functionless. It is possible in the same way to incorporate into the *ilvC* gene a second gene which codes for resistance to an antibiotic. The *ilvC* gene mutated in this way is likewise functionless. The *ilvC* with such a mutation can subsequently be introduced into a microorganism and replace the wild-type gene in its chromosome. Methods for carrying out this gene replacement are known in the literature. For *Escherichia coli* it is possible to employ the method described by Hamilton et al. (Journal of Bacteriology 171, 4617-4622 (1989)), which is based on temperature-sensitive replication mutants of the plasmid pSC101. A plasmid of this type is, for example, pMAK705. For *Corynebacterium glutamicum* it is possible to use the method of gene replacement described by Schwarzer and Pühler (BIO/TECHNOLOGY 9, 84-87 (1991)), in which non-replicative plasmid vectors are used. For *Saccharomyces cerevisiae*, a method of targeted gene replacement is described by Roca et al. (Nucleic Acid Research 20 (17), 4671-4672 (1992)).

A mutated *ilvC* gene can be produced from the wild-type *ilvC* gene for example in the following way. The plasmid pFE32 consists of pBR322 into whose *Bam*HII restriction cleavage site the *ilvC* wild-type gene has been incorporated. The *aacC1* gene which codes for resistance to the antibiotic gentamicin (Schweizer, BioTechniques 15 (5), 831-834 (1993)) was incorporated into the *Kpn*I cleavage site of the *ilvC* gene of pFE32. The plasmid pFE33 obtained in this way contains the *ilvC::aacC1* allele which is no longer able to form an *ilvC* gene product capable of

functioning. The *ilvC::aacC1* allele was removed from the plasmid pFE33 and inserted into the SphI cleavage site of the plasmid pMAK705, resulting in the plasmid pDB1. The plasmid pDB1 is a plasmid vector which is capable of allele replacement and consists firstly of pMAK705 and secondly of the *ilvC::aacC1* allele. Plasmid pDB1 was used in the method described by Hamilton et al. in order to replace the wild-type *ilvC* gene present in MG1655 by the *ilvC::aacC1* allele. The strain produced in this way was called FE4.

To isolate a mutant of FE4 harboring a mutation in the *panE* gene, the strain FE4 was subjected to transposon mutagenesis using the transposon Tn5. The transposon Tn5 is described by Auerswald (COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 45, 107-113 (1981)). The method of transposon mutagenesis is described, for example, in the handbook by Miller, A: Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for *Escherichia coli* and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992). The method is also described by Simon (Gene 80, 161-169 (1998)) and moreover in the handbook by Hagemann: Gentechnologische Arbeitsmethoden (Gustav Fischer Verlag, 1990) and numerous other publications available to the public. It is also possible to generate mutants after mutagenesis with ultraviolet light or after treatment with a mutation-inducing chemical such as, for example, N-methyl-N'-nitro-n-Nitrosoguanidine. Among the mutants obtained in this way it is possible after testing the growth substance requirements, in particular the pantothenic acid requirement, to isolate mutants harboring a mutation in a pantothenic acid biosynthesis gene. There is particular interest in mutants requiring pantothenic acid and able to utilize pantoate, but not ketopantoate, as growth substance and thus having a mutation in the *panE* gene which codes for ketopantoate reductase (EC 1.1.1.169). An example thereof is the strain FE5 which is obtained in this way and which, besides the *ilvC::aacC1* mutation, harbors a *panE::Tn5* mutation.

Microorganisms harboring a defect mutation in the *ilvC* gene and *panE* gene, such as, for example, the *Escherichia coli* strain FE5, can be used as cloning hosts for the isolation of the *ilvC* gene and of the *panE* gene of particular interest, or of nucleotide sequences which code for proteins with ketopantoate reductase activity.

For this purpose, a gene bank is set up for the microorganism of interest. The setting up of gene banks is set forth in generally known textbooks and handbooks. An example which may be mentioned is the textbook by Winnakker: Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) or the handbook by Sambrook et al., Molecular Cloning, A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). A well-known gene bank is that of the *E. coli* K-12 strain W3110, which was set up by Kohara et al. (Cell

50, 495-508 (1987)). Gene banks of various microorganisms can now be purchased, such as, for example, a gene bank of *Saccharomyces pombe* strain Sp63 from Stratagene (Heidelberg, Germany) in the plasmid lambda FIX II (Elgin, Strategies 4: 6-7 (1991), a gene bank of the *Escherichia coli* strain W1485 from CLONTECH (Heidelberg, Germany) in the plasmid pGAD10 (Kitts, CLONTECH (Heidelberg, Germany), whose nucleotide sequence is accessible under the GenBank accession number U13188. The gene bank produced in the manner described above can then be introduced by transformation into the host FE5 described above. Thus, by way of example, the pGAD10 gene bank of W1485 was introduced into the strain FE5 by transformation, and the resulting transformants were investigated for their ability to grow on a pantothenic acid-free nutrient medium. The insertions present in the plasmid DNA of the resulting pantothenic acid-prototrophic transformants can be investigated by determining the nucleotide sequence. Methods for determining nucleotide sequences can be referred to, for example, in Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Science USA 74: 5463-5467 (1977)). Nucleotide sequences can be assigned to genes by means of homology investigations. One possibility for this search for homologies is provided by comparison with nucleotide sequences of the EMBL and GenBank databases which can be carried out by means of the BLAST E-mail Service (Altschul, Journal of Molecular Biology 215, 403-410 (1990)). One example of such a transformant is the *Escherichia coli* strain FE5/pFEbank 16 which harbors the panE gene of the *E. coli* strain MG1655.

The panE gene which has been isolated and identified in the manner described can then be expressed in the required microorganism. For this it is amplified by plasmid vectors. These in turn can be equipped with signal structures which ensure efficient transcription and translation. A review of expression vectors is to be found, for example, in the textbook by Winnacker: *Gene und Klone, eine Einführung in die Gentechnologie* (Verlag Chemie, Weinheim, Germany, 1990) or in Sambrook et al.: *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). It is also possible to incorporate into the chromosome expression signals such as, for example, the tac promoter upstream of the panE gene. Methods of this type are described in WO 98/04715. A panE gene to be expressed can be removed from the cloned chromosomal DNA fragment or can in turn be amplified by means of a polymerase chain reaction. The amount of ketopantoate reductase present in the relevant microorganism can be determined using the method described by Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)). An example of a strain of this type is the *Escherichia coli* strain MG1655/pFE65. Plasmid pFE65 consists of the vector pKK223-3 into whose EcoRI restriction cleavage site the panE gene of *Escherichia coli* MG1655 has been incorporated.

It has proven advantageous according to the invention to enhance, in particular to overexpress, one or more genes of pantothenic acid biosynthesis, in addition to the panE gene coding for ketopantoate reductase. These include the genes for the enzymes ketopantoate hydroxymethyltransferase (EC.4.1.2.12), aspartate 1-decarboxylase (EC 4.1.1.11) and pantothenate synthetase (EC Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992)). For this purpose, the genes can be incorporated into various compatible plasmid vectors. Examples thereof are described by Bartolome et al. (Gene 102, 75-78 (1991)). It is also possible for gene expression to be increased by altering the chromosomal signal structures located upstream. The relevant genes can also be arranged in succession under the control of a common promoter and be incorporated into a plasmid vector and introduced into a suitable microorganism. An example thereof is the Escherichia coli strain MG1655/pFE80. The plasmid pFE80 consists of the plasmid pKK223-3 which comprises the panB, panD, panC and panE genes in the stated sequence. Upstream of the panB gene there is present in pFE80 the tac promoter as expression signal.

It has additionally proved advantageous to overexpress the panE gene and the expression unit consisting of the panB, panD, panC and panE genes in host strains which comprise chromosomal mutations.

It is possible to use, singly or jointly, mutations which confer resistances to metabolic products such as, for example, L-valine or α -ketoisovaleric acid or to analogs of metabolic products such as, for example, β -hydroxyaspartic acid or O-methylthreonine. Mutants of these types occur spontaneously or can be generated by mutagenesis with ultraviolet light or after treatment with a mutation-inducing chemical such as, for example, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, and then be selected on agar plates containing the appropriate substance. Methods for inducing mutation and for selection are generally known and can be referred to inter alia in Miller (A Short Course in Bacterial Genetics, A Laboratory Manual and Handbook for Escherichia coli and Related Bacteria (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992) or in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA). An example of a mutant of this type is the Escherichia coli strain FE6, which was isolated as a spontaneously occurring mutant, resistant to L-valine, of the strain MG1655.

It is additionally possible specifically to switch off unfavorable or interfering chromosomally encoded metabolic reactions. For this purpose, insertions or deletions are introduced into the appropriate genes, and the mutated genes or alleles produced in this way can be incorporated into the chromosome of the relevant host. The methods described above for the mutation of the ilvC gene can be

employed. An example of a mutant of this type is the Escherichia coli strain FE7, which harbors an *avtA::aadB* mutation in the chromosome. This comprises the strain MG1655 into whose *avtA* gene the *aadB* gene, which confers resistance to streptomycin, from the plasmid pHP45Ω (Prentki und Krisch, Gene 29, 303-313 (1984)) has been inserted.

The *panE* gene can then be overexpressed, alone or in combination with other genes, in the host strains produced in this way. Examples thereof are the strains FE6/pFE80 and FE7/pFE80.

The microorganisms produced according to the invention can be cultivated continuously or batchwise in a batch process or in a fed batch or repeated fed batch process in order to produce pantothenic acid. A summary of known cultivation methods is to be found in the textbook by Chmiel (Bioprozesstechnik 1. Einführung in die Bioverfahrenstechnik (Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, 1991)) or in the textbook by Storhas (Bioreaktoren und periphere Einrichtungen (Vieweg Verlag, Braunschweig/Wiesbaden, 1994)). The culture medium to be used must meet the requirements of the particular microorganisms in a suitable manner. Descriptions of culture media for various microorganisms are present in the handbook "Manual of Methods for General Bacteriology" of the American Society for Bacteriology (Washington D.C., USA, 1981). It is possible to use as source of carbon sugars and carbohydrates such as, for example, glucose, sucrose, lactose, fructose, maltose, molasses, starch and cellulose, oils and fats such as, for example, soybean oil, sunflower oil, peanut oil and coconut fat, fatty acids such as, for example, palmitic acid, stearic acid and linoleic acid, alcohols such as, for example, glycerol and ethanol and organic acids such as, for example, acetic acid. These substances can be used singly or as mixture. It is possible to use as source of nitrogen organic nitrogen-containing compounds such as peptones, yeast extract, meat extract, malt extract, corn steep liquor, soybean flour and urea or inorganic compounds such as ammonium sulfate, ammonium chloride, ammonium phosphate, ammonium carbonate and ammonium nitrate. The sources of nitrogen can be used singly or as mixture. It is possible to use as source of phosphorus phosphoric acid, potassium dihydrogen phosphate or dipotassium hydrogen phosphate or the corresponding sodium-containing salts. The culture medium must additionally contain salts of metals such as, for example, magnesium sulfate or iron sulfate, which are necessary for growth. Finally, it is possible to employ essential growth substances such as amino acids and vitamins in addition to the abovementioned substances. In addition to these, precursors of pantothenic acid such as β-alanine or ketopantoic acid and salts thereof can be added to the culture medium. Said starting materials can be added to the culture in the form of a single batch or be fed in during the cultivation in a suitable manner.

The pH of the culture is controlled by employing basic compounds such as sodium hydroxide, potassium hydroxide, ammonia or acidic compounds such as phosphoric acid or sulfuric acid in a suitable manner. Foaming can be controlled by employing antifoams such as, for example, fatty acid polyglycol esters or silicone oils. To maintain the stability of plasmids it is possible to add to the medium suitable substances having a selective effect, for example antibiotics. Aerobic conditions are maintained by introducing oxygen or oxygen-containing gas mixtures such as, for example, air into the culture. The temperature of the culture is normally 20°C to 50°C and preferably 25°C to 45°C. The culture is continued until pantothenic acid formation is at a maximum. This aim is normally achieved within 10 hours to 160 hours.

The concentration of pantothenic acid formed can be determined by known methods (Velisek; Chromatographic Science 60, 515-560 (1992)).

The following microorganisms have been deposited at the Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Germany) in accordance with the Budapest Treaty:

- Escherichia coli K12 strain FE5 as DSM12378
- Escherichia coli K12 strain MG1655/pFE32 as DSM12413
- Escherichia coli K12 strain MG1655/pFE65 as DSM12382
- Escherichia coli K12 strain MG1655/pFE80 as DSM12414
- Escherichia coli K12 strain FE6 as DSM12379
- Escherichia coli K12 strain FE7 as DSM12380

The process according to the invention provides the skilled worker with a novel tool for targeted improvement of pantothenic acid formation by microorganisms.

Examples

The present invention is explained in detail below by means of examples.

Example 1

Production of an ilvC::aacC1 panE::Tn5 mutant of Escherichia coli K12 strain MG1655

1. Production of the ilvC::aacC1 mutant

PCR primers were synthesized (MWG Biotech (Ebersberg, Germany)) on the basis of the nucleotide sequence for the ilvC gene in E. coli K12MG1655 (EMBL-GenBank: Accession No. M87049). It was possible to amplify a DNA

fragment about 1500 bp size using these primers in the standard PCR method of Innis et al. (PCR protocols. A guide to methods and applications, 1990, Academic Press). The chromosomal *E. coli* K12MG1655 DNA employed for the PCR was isolated using the NucleoSpin C + T kit (Macherey-Nagel (Düren, Germany), product description for NucleoSpin C + T, Cat. No. 740952). The size was determined by electrophoretic fractionation (30 minutes, 10 v/cm) in a 0.8% agarose gel.

PCR primers for the *ilvC* gene from *E. coli*:

<i>ilvC1</i>	5' - AGAACGACAACATCACGGAGG	-3'
<i>ilvC2</i>	5' - CTCCAGGAGAAGGCTTGAGT	-3'

The PCR product of the *ilvC* gene was transformed into the plasmid pCR®2.1 and into the *E. coli* strain TOP10F' (Invitrogen (Leek, Netherlands), product description for Original TA Cloning® kit, Cat. No. KNM2030-01).

The success of cloning was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid pCR®2.1*ilvC* with the restriction enzymes EagI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for EagI, code No. 27-0885-01), EcoRI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for EcoRI, code No. 27-0884-03) and KpnI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for KpnI, code No. 27-0908-01). For this, the plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin plasmid kit (QIAGEN (Hilden, Germany), Cat. no. 27106) and, after cleavage, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm).

To isolate the *ilvC* gene from the plasmid pCR®2.1*ilvC*, the isolated plasmid DNA was cleaved with the enzymes HindIII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for HindIII, code No. 27-0860-01) and XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for XbaI, code No. 27-0948-01), the cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and the 1.5 kbp *ilvC* fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit (GIBCO BRL (Eggenstein, Germany), product description for GLASSMAX™ spin cartridges, Cat. No. 15590-052). The isolated *ilvC* fragment was ligated with the plasmid pMAK705 (Hamilton et al., Journal of Bacteriology 1989, 171: 4617-4622), which had likewise been cleaved with HindIII and XbaI, using T4 DNA ligase (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description T4 DNA ligase, code No. 27-0870-03), and the *E. coli* strain DH5αmcr (Grant, Proceedings of the National Academy of Science 1990, 87: 4645-4649) was electroporated with the ligation mixture (Tauch, FEMS Microbiology Letters 1994, 123: 343-347). Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar (Lennox, Virology 1955, 1:190), which was mixed with 25 µg/ml chloramphenicol (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. C 0378) and incubating at 30°C for

24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage using the enzymes HindIII, XbaI and KpnI, with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and was called pFE30.

To isolate the *ilvC* gene from the plasmid pFE30, the isolated plasmid DNA was cleaved with the enzyme BamHI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for BamHI, code No. 27-0868-03), a cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and the 1.5 kbp *ilvC* fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit. The isolated *ilvC* fragment was ligated with the plasmid pBR322 (Sutcliffe, COLD SPRING HARBOR SYMPOSIA ON QUANTITATIVE BIOLOGY 1979, 43: 77-90), which had likewise been cleaved with BamHI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain DH5αmcr was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar which was mixed with 100 µg/ml ampicillin (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. A 9518) and incubated at 37°C for 24 hours. Resulting colonies were inoculated in parallel on LB+ampicillin agar and LB+(5 µg/ml)tetracycline (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. T3383). DNA from tetracycline-sensitive colonies was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of cloning was verified by a BamHI and KpnI cleavage and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The constructed plasmid was called pFE32.

An *aacC1* gene was cloned into the KpnI cleavage site of the plasmid pFE32 and the resulting plasmid was called pFE33. The *aacC1* gene was for this purpose isolated from an agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) in which a KpnI restriction mixture of the plasmid pMS255 (Becker, Gene 1995, 162: 37-39) had been fractionated. Ligation took place with T4 DNA ligase. After electroporation of the ligation mixture into the strain DH5αmcr, the transformants were selected on PA agar (Sambrook, Molecular cloning, 2nd edn., Cold Spring Harbor, 1989), which was mixed with 10 µg/ml gentamicin (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. G3632). DNA from gentamicin-resistant colonies was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of cloning was verified by a BamHI and KpnI cleavage and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm).

The *ilvC::aacC1* fragment was cleaved out of the plasmid pFE33 by SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for SphI, code No. 27-0951-01) restriction, fractionated in the 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and isolated using the GLASSMAX™ kit. The fragment was ligated with the SphI-cleaved plasmid pMAK705 using T4 DNA ligase, the ligation mixture was electroporated into the strain DH5αmcr, and transformants were selected by incubation on PA+gentamicin agar at 30°C for 24 hours. DNA from gentamycin-resistant colonies

was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of cloning was demonstrated by an SphI and EcoRI cleavage followed by fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The constructed plasmid was called pDB1.

The plasmid pDB1 was used to replace the chromosomal ilvC gene in the strain E. coli K12 MG1655 by the interrupted ilvC::aacC1 fragment. A modification of the method of Hamilton et al. was used for the gene replacement. The plasmid pDB1 was electroporated into the E. coli K12 MG1655 strain, and then the transformants were incubated on LB chloramphenicol agar at 42°C for 24 hours to select for cointegrates. The resulting colonies were isolated by once again streaking onto the same medium and incubating at 42°C for 24 hours. To disintegrate the plasmid, single colonies were incubated in 5 ml of LB liquid medium at 42°C for 24 hours and then serial dilutions of the liquid medium were plated out on LB-chloramphenicol agar. These serial dilutions were incubated at 30°C for 24 hours. For curing from the plasmid, single colonies obtained from these serial dilutions were cloned in 3 consecutive single-colony streaks on LB agar at 42°C for 24 hours in each case. To check the phenotype, the resulting single colonies were inoculated in parallel on agar plates with the following media: mediumE (Vogel, Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) + glucose (0.4%), mediumE + glucose (0.4%) (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. G8270) + 50 µg/ml isoleucine (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. 17268), mediumE + glucose (0.4%) + 50 µg/ml ketoisovalerate (ICN (Eschwege, Germany), code No. 151395), mediumE + glucose (0.4%) + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate, PA medium + gentamycin and LB medium + chloramphenicol. These media were incubated at 37°C for 48 hours. Among 150 tested single colonies there was one whose phenotype indicated replacement of the chromosomal ilvC gene by the ilvC::aacC1 fragment. This strain was called FE4.

2. Production of the ilvC::aacC1 panE::Tn5 double mutant

The strain FE4 was grown in 5 ml of LB liquid medium + 10 mM MgSO₄ + 0.2% maltose (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. M5885) (LBMgMal) at 37°C until the optical density was 0.5. The optical density was measured using a Pharmacia (Freiburg, Germany) Novaspec II photometer at a wavelength of 660 nm. 2 ml of the bacteria solution were centrifuged at 3000 rpm for 5 min (Beckmann Model J2-21 Centrifuge, RotorJA-17). After the pellet had been taken up in 0.5 ml of LBMgMal liquid medium, the suspension was mixed with 30 µl of λ::Tn5(Simon, Gene 1989, 80(1):161-169) lysate, about 10⁸ bacteriophages. This lysate was isolated from the strain E. coli K12 C600 (Appleyard, Genetics 1954, 39: 440-452) by the method of Hagemann (Gentechnologische Arbeitsmethoden, Gustav Fischer Verlag, 1990: 14-18). The suspension with the λ::Tn5 lysate was incubated at 30°C for 45 minutes.

After centrifugation at 3000 rpm for 5 minutes, the pellet was taken up in 10 ml PA + 10 mM pyrophosphate and incubated at 37°C for 3 hours. The bacteria solution was plated out as serial dilutions on mediumE agar + glucose (0.4%) + 25 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate + 50 µg/ml pantothenate and incubated at 37°C for 48 hours. Single colonies were inoculated in parallel on mediumE agar + glucose (0.4%) + 25 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate + 50 µg/ml pantothenate and on mediumE agar + glucose (0.4%) + 25 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate and incubated at 37°C for 48 hours. Among 14,000 inoculated single colonies it was possible to identify one colony, called FE5, which grew on mediumE agar + glucose (0.4%) + 25 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate + 50 µg/ml pantothenate but not on mediumE agar + glucose (0.4%) + 25 µg/ml kanamycin + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate.

3. Characterization of the strains FE4 and FE5

The strains of FE4 and FE5 were streaked, together with the *E. coli* strain SJ2 (Jakowski, Genetic Stock Center, Yale University) which harbors a mutation in the panB gene, MW6 (Williams, Genetic Stock Center, Yale University) which harbors a mutation in the panC gene, and DV9 (Vallari, Journal of Bacteriology 1985, 164: 136-142) which harbors a mutation in the panD gene, and with a wild-type, on basic media with different supplements (mediaE agar + glucose (0.4%) + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate; additionally 50 µg/ml thiamine for SJ2, DV9 and MW6) and incubated at 37°C for 48 hours. The additional supplements used were pantothenate (calcium salt) ketopantoate (sodium salt), β-alanine (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. A7752) and pantoate (potassium salt). Ketopantoate was prepared from ketopantolactone by treatment with equimolar amounts of NaOH at 60°C and subsequent evaporation. Ketopantolactone was synthesized by the method of Ojima et al. (Organic Synthesis 63, 18 (1985)). Pantoate was prepared from pantoyllactone (Sigma (Deisenhofen, Germany), code No. P2625) by the method of Primerano and Burns (Journal of Bacteriology 1983, 153: 259-269). The result of the growth test (Table 1) shows that the strain FE4 grew on all the basic media with different supplements. The strain FE5 grew only on media which were supplemented either with pantothenate or pantoate but not on basic media mixed with ketopantoate.

Table 1

Strain	Supplements to the basic medium				
	none	β -alanine (50 μ g/ml)	ketopantoate [50 μ g/ml]	pantoate [50 μ g/ml]	pantothenate [50 μ g/ml]
MG1655	+	+	+	+	+
SJ2	-	-	+	+	+
MW6	-	-	-	-	+
DV9	-	+	-	-	+
FE4	+	+	+	+	+
FE5	-	-	-	+	+

+ = growth

- = no growth

Example 2

Isolation of the panE gene from Escherichia coli K12 strain W1485

The E. coli K12 W1485 MATCHMAKER genomic library (CLONTECH (Heidelberg, Germany), Cat. No. XL4001AB) was electroporated into the strain FE5. The E. coli K12 MATCHMAKER genomic library contains the chromosomal DNA from E. coli K12 W1485 as inserts averaging 1.0 kbp in size in the plasmid pGAD10, with the size of the individual inserts varying from 0.5 to 3.0 kbp (CLONTECH (Heidelberg, Germany)). The transformants were selected by plating out on mediumE agar + glucose (0.4%) + 100 μ g/ml ampicillin + 50 μ g/ml isoleucine + 50 μ g/ml ketoisovalerate. The plasmid DNA was isolated from 20 resulting colonies using the QIAprep spin plasmid kit. It was shown by an EcoRI cleavage of the plasmid DNA and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) that the plasmids comprised 20 pGAD10 vectors with inserts of different sizes. Sequencing (Ilt Biotech (Bielefeld, Germany)) of the inserts revealed through homology comparisons using the BLAST program (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410) that the inserts contained in 7 cases a complete ilvC

gene and in 13 cases an open reading frame which was referred to as "similar to *Salmonella typhimurium* *apbA*" (EMBL-GenBank: Accession No. U82664). This open reading frame was called panE.

Example 3

Overexpression of the *ilvC* gene from *E. coli* in the *E. coli* K12 strain MG1655

The plasmid pFE32 (see Example 1) was used for overexpression of the *ilvC* gene. The coding region of the *ilvC* gene in the plasmid pFE32 is under the control of the tet promoter encoded by the plasmid pBR322. The plasmid pFE32 was electroporated into the strain *E. coli* K12 MG1655, and transformants were selected on LB agar, which was mixed with 100 µg/ml ampicillin, after subsequent incubation at 37°C for 24 hours. The resulting strain was called MG1655/pFE32.

Example 4

Overexpression of the panE gene from *E. coli* in the *E. coli* K12 strain MG1655

PCR primers were synthesized (MWG Biotech (Ebersberg, Germany)) based on the nucleotide sequence for the panE gene in *E. coli* K12 MG1655. It was possible to amplify a DNA fragment about 1000 bp in size from chromosomal *E. coli* K12 MG1655 DNA using these primers in the standard PCR method. The chromosomal *E. coli* K12 MG1655 DNA employed for the PCR was isolated using the NucleoSpin C + T kit. The size was determined by electrophoretic fractionation (30 minutes, 10 V/cm) in a 0.8% agarose gel.

PCR primers for the panE gene from *E. coli*:

panE1 5' - AGGAGGGACAATGAAAATTAC -3'

panE2 5' - TCAGTCTCTTCACTACCAGG -3'

The PCR product of the panE gene was transformed into the plasmid pCR®2.1 and into the *E. coli* strain TOP10F' (Invitrogen (Leek, Netherlands), product description for Original TA Cloning® kit, Cat. No. KNM2030-01). The success of cloning was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid pCR®2.1panE with the restriction enzymes EcoRI and HinclI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for HinclI, code No. 27-0858-01). For this, the plasmid DNA was

isolated using the QIAprep spin plasmid kit and, after cleavage, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm).

To isolate the panE gene from the plasmid pCR®2.1panE, the isolated DNA was cleaved with the enzyme EcoRI, the cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and the 1.0 kbp panE fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit. The isolated panE fragment was ligated with the plasmid pKK223-3, which had likewise been cleaved with EcoRI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain DH5 α mcr was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar which was mixed with 100 μ g/ml ampicillin and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the enzymes EcoRI and HinclI, with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and was called pFE65.

The coding region of the panE gene in the plasmid pFE65 is under the control of the tac promoter encoded by the plasmid pKK223-3. The plasmid pFE65 was electroporated into the strain *E. coli* K12 MG1655, and transformants were selected on LB agar mixed with 100 μ g/ml ampicillin, with subsequent incubation at 37°C for 24 hours. The resulting strain was called *E. coli* K12 MG1655/pFE65.

Example 5

Overexpression of the panE gene from *E. coli* together with panB, panC and panD from *E. coli* in the *E. coli* K12 strain MG1655

PCR primers were synthesized (MWG Biotech (Ebersberg, Germany)), based on the nucleotide sequence for the panB gene, panC gene and panD gene in *E. coli* K12 MG1655 (EMBL-GenBank: Accession No. L17086). It was possible to amplify from chromosomal *E. coli* K12 MG1655 DNA using the standard PCR method a DNA fragment about 800 bp in size using the panB primers, and a DNA fragment about 400 bp in size using the panD primers. It was possible with the panC primers to amplify a DNA fragment about 850 bp in size from chromosomal *E. coli* K12 MG1655 DNA using a modification of the standard PCR method. The taq polymerase was replaced by the Pfu polymerase, and the buffer conditions in the PCR mixture were modified correspondingly (STRATAGENE (Heidelberg, Germany), product description for Pfu polymerase, code No. 600135). The chromosomal *E. coli* K12 MG1665 DNA employed for the PCR was isolated using the NucleoSpin C + T kit. The size of all the amplicons was determined by electrophoretic fractionation (30 minutes, 10 V/cm) in a 0.8% agarose gel.

PCR primers for the panB gene from E. coli:

panB1 5' - AGGATACGTTATGAAACCGA -3'

panB2 5' - ACAACGTGACTCCTTAATGG -3'

PCR primers for the panC gene from E. coli:

panC1 5' - AGGAGTCACGTTGTGTTAAT -3'

panC2 5' - AAGTATTACGCCAGCTCGAC -3'

PCR primers for the panD gene from E. coli:

panD1 5' - AGGTAGAAGTTATGATTGCG -3'

panD2 5' - TAACAATCAAGCAACCTGTA -3'

The PCR product of the panB gene was transformed into the plasmid pCR®2.1 and into the E. coli strain TOP10F' (Invitrogen (Leek, Netherlands)). The success of cloning of the panB PCR product was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid PCR®2.1panB with the restriction enzymes EcoRI, EcoRV (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for EcoRV, code No. 27-0934-01) and Pvull (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for Pvull, code No. 27-0960-01). For this, the plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin plasmid kit and, after cleavage, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The PCR product of the panD gene was transformed into the plasmid pCR®2.1 and into the E. coli strain TOP10F' (Invitrogen (Leek, Netherlands)). The success of cloning of the panD PCR product was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid pCR®2.1panD with the restrictions enzymes EcoRI, EcoRV and HinclI. For this, the plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin plasmid kit and, after cleavage, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The PCR product of the panC gene was electroporated into the plasmid pUC19 (Vicra, Gene 1982 19: 259-268) and into the E. coli strain DH5αmcr. The success of cloning of the panC PCR product was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid pUC19panC with the restriction enzymes EcoRI, HindIII and Sall (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for Sall, code No. 27-0882-01). For this, the plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin plasmid kit and, after cleavage,

fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The constructed plasmid was called pFE60. To isolate the panB gene from the plasmid pCR®2.1panB, the isolated plasmid DNA was cleaved with the enzyme EcoRI, the cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and the 800 bp panB fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit. The isolated panB fragment was ligated with the plasmid pKK223-3, which had likewise been cleaved with EcoRI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain DH5 α mcr was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar mixed with 100 μ g/ml ampicillin and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the restriction enzymes EcoRI, EcoRV and Pvull with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The coding region of the panB gene in the plasmid pFE40 is under the control of the tac promoter which is encoded by the plasmid pKK223-3.

To isolate the panD gene from the plasmid pCR®2.1 panD, the isolated plasmid DNA was cleaved with the enzyme EcoRI, the cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and the 400 bp panD fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit. The isolated panD fragment was isolated with the plasmid pKK223-3, which had likewise been cleaved with EcoRI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain DH5 α mcr was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar mixed with 100 μ g/ml ampicillin and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the enzymes EcoRI, EcoRV and Hincll with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The coding region of the panD gene in the plasmid pFE50 is under the control of the tac promoter encoded by the plasmid pKK223-3.

The panC gene was isolated by HindIII-SmaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for SmaI, code No. 27-0942-01) cleavage from the plasmid pFE60, fractionating the cleavage mixture in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and isolating the 850 bp panC fragment using the GLASSMAX™ kit. The isolated panC fragment was ligated with the plasmid pFE50, which had likewise been cleaved with HindIII and SmaI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain DH5 α mcr was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar mixed with 100 μ g/ml ampicillin and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the enzymes EcoRI, EcoRV, SmaI, HindIII and Hincll, with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes,

10 V/cm) and was called pFE52. The coding region of the panD gene and of the panC gene in the plasmid pFE52 are under the control of the tac promoter encoded by the plasmid pKK223-3, and form an operon.

The panB gene was cloned into the EcoRI cleavage site following the tac promoter in the plasmid pFE52, and the resulting plasmid was called pFE70. The panB gene was for this purpose isolated from an agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) in which an EcoRI restriction mixture of the plasmid pFE40 had been fractionated. Ligation took place with T4 DNA ligase. After electroporation of the ligation mixture into the strain SJ2, the transformants were selected on mediumE agar mixed with 0.4% glucose, 100 µg/ml thiamine and 100 µg/ml ampicillin. DNA from ampicillin-resistant colonies was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of the cloning was verified by an EcoRI, EcoRV, SmaI, HindIII and HinclI cleavage and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The coding region of the panB gene, panD gene and panC gene in the plasmid pFE70 are under the control of the tac promoter encoded by the plasmid pKK223-3, and form an operon.

The panE gene was isolated by a HindIII-SphI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for SphI, Code No. 27-0951-01) cleavage from the plasmid pFE65, fractionating the cleavage mixture in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and isolating the panE fragment using the GLASSMAX™ kit. The isolated panE fragment was ligated with the plasmid pFE70, which had likewise been cleaved with HindIII and partially with SphI, using T4 DNA ligase, and the strain FE5 was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on mediumE agar + glucose (0.4%) + 50 µg/ml isoleucine + 50 µg/ml ketoisovalerate mixed with 100 µg/ml ampicillin and subsequent incubation at 37°C for 48 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the enzymes EcoRI, EcoRV, SphI, HindIII and HinclI, with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and was called pFE80. The coding region of the panB gene, panD gene, panC gene and panE gene in the plasmid pFE80 are under the control of the tac promoter encoded by the plasmid pKK223-3, and form an operon.

The plasmid pFE80 was electroporated into the strain E. coli K12 MG1655, and transformants were selected on LB agar which was mixed with 100 µg/ml ampicillin, and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The resulting strain was called MG1655/pFE80.

Example 6

Overexpression of the panE gene from *E. coli* together with panB, panC and panD from *E. coli* in a valine-resistant mutant of *E. coli* K12 MG1655

The *E. coli* K12 strain MG1655 was streaked onto mediumE agar which was mixed with 0.4% glucose and 100 µg/ml valine (Sigma (Deisenhofen, Germany), V0258). After incubation at 37°C for 48 hours it was possible to isolate a colony. This strain was called FE6. The plasmid pFE80 was electroporated into the strain FE6, and transformants were selected on LB agar mixed with 100 µg/ml ampicillin, subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The resulting strain was called FE6/pFE80.

Example 7

Overexpression of the panE gene from *E. coli* together with panB, panC and panD from *E. coli* in an avtA::aadB mutant of *E. coli* K12 MG1655

PCR primers were synthesized (MWG Biotech (Ebersberg, Germany)) based on the nucleotide sequence for the avtA gene (EMBL-GenBank: Accession No. Y00490) in *E. coli* K12 MG1655. It was possible to amplify a DNA fragment about 1.6 kbp in size from chromosomal *E. coli* K12 MG1655 DNA using these primers in the standard PCR method. The size was determined by electrophoretic fractionation (30 minutes, 10 V/cm) in a 0.8% agarose gel. PCR primers for the avtA gene from *E. coli*:

avtA1	5'- TGCTCTCTCTAACGCCGAA	-3'
avtA2	5'- GAAGCCGCCAACCAGGATAA	-3'

The PCR product of the avtA gene was transformed into the plasmid pCR®2.1 and into the *E. coli* strain TOP10F' (Invitrogen (Leek, Netherlands)). The success of cloning was demonstrated by cleavage of the DNA of the plasmid pCR®2.1avtA with the restriction enzymes EcoRI and SmAl. For this purpose, the plasmid DNA was isolated using the QIAprep spin plasmid kit and, after cleavage, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). An aadB gene was cloned into the Smal cleavage site of the plasmid pCR®2.1avtA, and the resulting plasmid was called pFE23. The aadB gene was for this purpose isolated from an agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) in which a Smal restriction mixture of the plasmid pHp45Ω (EMBL-GenBank: Accession No. K02163) had been fractionated. Ligation took place

with T4 DNA ligase. After electroporation of the ligation mixture into the strain DH5 α mcr, the transformants were selected on PA agar mixed with 20 μ g/ml streptomycin (Sigma (Deisenhofen, Germany), Code No. S6501). DNA from streptomycin-resistant colonies was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of the cloning was verified by an EcoRI and SphI cleavage and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm).

The avtA::aadB fragment was cleaved out of the plasmid pFE23 by EcoRI restriction, fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and isolated using the GLASSMAX™ kit. The fragment was ligated with the plasmid pMAK705, which had been partially cleaved with EcoRT, using T4 DNA ligase, the ligation mixture was electroporated into the strain DH5 α mcr, and transformants were selected by incubation on LB agar + 20 μ g/ml streptomycin + 25 μ g/ml chloramphenicol at 30°C for 24 hours. DNA from streptomycin- and chloramphenicol-resistant colonies was isolated using the QIAprep spin plasmid kit, and the success of the cloning was demonstrated by an SphI and EcoRI cleavage and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm). The constructed plasmid was called pFE24.

The chromosomal avtA gene in the strain E. coli K12 MG1655 was replaced by the avtA::aadB allele with the aid of the plasmid pFE24. A modification of the method of Hamilton et al. was used for the gene replacement. The plasmid pFE24 was electroporated into the E. coli K12 MG1655 strain, and then the transformants were incubated on LB-chloramphenicol agar at 42°C for 24 hours to select for cointegrates. The resulting colonies were isolated by streaking once again onto the same medium and incubating at 42°C for 24 hours. To disintegrate the plasmid, single colonies were incubated in 5 ml of LB liquid medium at 42°C for 24 hours, and then serial dilutions of the liquid medium were plated out on LB-chloramphenicol agar. These serial dilutions were incubated at 30°C for 24 hours. For curing from the plasmid, single colonies obtained from the serial dilutions were grown in three consecutive single colony streaks onto LB agar at 42°C for 24 hours in each case.

To check the phenotype, the resulting single colonies were inoculated in parallel onto agar plates with LB medium + 20 μ g/ml streptomycin and LB medium + 25 μ g/ml chloramphenicol. These media were incubated at 37°C for 48 hours. Among 250 tested single colonies there was one whose phenotype indicated replacement of the chromosomal avtA gene by the avtA::aadB fragment. This strain was called FE7.

The plasmid pFE80 was electroporated into the strain FE7, and transformants were selected on LB agar mixed with 100 μ g/ml ampicillin,

subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The resulting strain was called FE7/pFE80.

Example 8

Determination of the ketopantoate reductase activity in various strains of Escherichia coli K12

The specific ketopantoate reductase activity was determined by the method described by Shimizu et al. (Journal of Biological Chemistry 263: 12077-12084 (1988)). For this, cell extracts of the individual strains were obtained using a Hybaid RiboLyser (Heidelberg, Germany) and the RiboLyser Kit Blue. The ketopantoate reductase activity of the extracts was determined on the basis of the NADPH consumption on addition of ketopantoate. A specific ketopantoate reductase activity of 6.5 mU/mg was determined for the strain E. coli K12 MG1655, and one of 22.0 mU/mg was determined for the strain E. coli K12 MG1655/pFE65. There was no measurable activity in the case of the strain FE5.

Example 9

Formation of pantothenate by various strains of Escherichia coli K12

The formation of pantothenate by the strains MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65, MG1655/pFE80, FE6/pFE80 and FE7/pFE80 was tested in batch culture. The culture medium was the mediumE described by Vogel (Journal of Biological Chemistry 1956, 218: 97-106) with glucose (0.4%) as source of carbon. The composition of the medium used is shown in Table 2.

Table 2

Compound	Concentration
MgSO ₄ *7H ₂ O	0.2 g/l
Citric acid monohydrate	2.0 g/l
K ₂ HPO ₄	10.0 g/l
NaNH ₄ HPO ₄ *H ₂ O	3.5 g/l

250 ml Erlenmeyer flasks were charged with 25 ml of the stated nutrient medium, and the mixture was inoculated. After an incubation time of 48 hours at 37°C, the optical density and the pantothenate concentration were

determined. The cell density was determined by measuring the optical density with a Novaspec II photometer from Pharmacia (Freiburg, Germany) at a measurement wavelength of 580 nm. The pantothenate content was determined in the culture supernatant which had been sterilized by filtration. Pantothenate (as calcium salt) was determined using the strain *Lactobacillus plantarum* ATCC® 8014 as stated in the handbook "DIFCO MANUAL" from DIFCO (Michigan, USA; 10th Edition, 1100-1102 (1984)). The result is summarized in Table 3.

Table 3

Strain	Concentration [µg/ml]	Cell density [OD ₅₈₀]	Productivity [µg/ml/OD ₅₈₀]
MG1655	0.51	2.8	0.18
MG1655/pFE32	1.7	2.8	0.60
MG1655/pFE65	4.6	2.9	1.6
MG1655/pFE80	14.0	2.9	4.8
FE6/pFE80	35.7	3.2	11.2
FE7/pFE80	41.7	3.0	13.9

Example 10

Formation of pantothenate by various strains of *Escherichia coli* K12 in the presence of ketopantoate

The formation of pantothenate by the strains MG1655, MG1655/pFE32, MG1655/pFE65 with added ketopantoate was tested in batch culture. For this, the medium described in Example 8 was supplemented with 50 µg/ml ketopantoate. The other experimental conditions were as stated in Example 8. The result is summarized in Table 4.

Table 4

Strain	Concentration [µg/ml]	Cell density [OD ₅₈₀]	Productivity [µg/ml/OD ₅₈₀]
MG1655	6.2	2.9	2.1
MG1655/pFE32	9.0	2.9	3.1
MG1655/pFE65	12.6	2.9	4.3

Example 11

Isolation of the *ilvC* gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Chromosomal DNA from *C. glutamicum* ATCC13032 was isolated as described by Tauch et al. (Plasmid, 33: 168-179, 1995) and partially cleaved with the restriction enzyme Sau3A (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for Sau3A, Code No. 27-0913-02). DNA fragments in the 7-9 kb size range were isolated using the "Nucleotrap Extraction Kit for Nucleic Acids" (Macherey and Nagel, Düren, Germany; Cat. No. 740584) and ligated into the dephosphorylated BamHI cleavage site of the vector pUC19 (Viera et al., 1982, Gene, 19: 259-268; MBI Fermentas, Lithuania). The ligation was carried out as described by Sambrook et al. (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor), incubating the DNA mixture with T4 ligase (Pharmacia Biotech, Freiburg, Germany) overnight. This ligation mixture was then electroporated (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-348) into the *E. coli* strain DH5 α mcr (Grant, 1990, Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 87: 4656-4649) and plated out on LB agar (Lennox, 1955, Virology, 1: 190) + 100 μ g/ml ampicillin. After incubation at 37°C for 24 h it was possible to obtain the *C. glutamicum* gene bank from the transformants by reisolation of the plasmid DNA by the "alkaline lysis method" of Birnboim and Doly (1979, Nucleic Acids Research, 7: 1513-1523). This gene bank was used for electroporation of competent cells of the *E. coli* strain FE5 which harbors mutations in the *panE* and *ilvC* gene. The electroporation mixture was, following the regeneration phase (Tauch et al., 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-347), washed twice with mediumE (Vogel and Bonner, 1956, Journal of Biological Chemistry, 218: 97-106). The transformants were selected by plating out on mediumE agar + glucose (0.4%) + 100 μ g/ml ampicillin + 50 μ g/ml isoleucine + 50 μ g/ml ketoisovalerate. The plasmid DNA was isolated from 4 resulting colonies using the QIAprep spin plasmid kit. It was shown, by XbaI cleavage of the plasmid DNA and subsequent fractionation in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), that the plasmids comprised pUC19 vectors with inserts about 6.5 kbp in size. Sequencing of the inserts with subsequent comparisons of homology by means of the BLAST program (Altschul, Journal of Molecular Biology 1990, 215: 403-410) revealed that the inserts contained in all cases a complete *ilvC* gene from *C. glutamicum* (EMBL-GenBank: Accession No. L09232). One of these plasmids was called pFE90.

Example 12

Expression of the ilvC gene from *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

The plasmid pECm3 was used for expression of the ilvC gene from *C. glutamicum* in *C. glutamicum* ATCC13032. The plasmid pECm3 is a derivative of the plasmid pECm2 (Tauch, 1994, FEMS Microbiological Letters, 123: 343-348), whose kanamycin resistance gene has been deleted by a BgIII (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for BgIII, code No. 27-0946-02) and BamHI (Freiburg, Germany), product description for BamHI, code No. 27-0948-01) and subsequent religation. The plasmids pECm2 and pECm3 are able to replicate both in *E. coli* and in *C. glutamicum*. To isolate the ilvC gene from the plasmid pFE90 (Example 11), the isolated plasmid DNA was cleaved with the enzyme XbaI (Pharmacia Biotech (Freiburg, Germany), product description for XbaI, code No. 27-0948-01), the cleavage mixture was fractionated in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm) and the 6.5 kbp ilvC fragment was isolated using the GLASSMAX™ kit. The isolated ilvC fragment was ligated with the plasmid pECm3, which had likewise been cleaved with XbaI, using T4 DNA ligase, and the *E. coli* strain FE5 was electroporated with the ligation mixture. Selection for plasmid-harboring cells took place by plating out the electroporation mixture on LB agar mixed with 50 µg/ml chloramphenicol, and subsequently incubating at 37°C for 24 hours. The plasmid which was sought was identifiable in one clone after DNA isolation and control cleavage with the enzyme XbaI, with subsequent gel electrophoresis in a 0.8% agarose gel (30 minutes, 10 V/cm), and was called pFE91.

The plasmid pFE91 was electroporated into the strain *C. glutamicum* ATCC13032, and transformants were selected on LB agar mixed with 7.5 µg/ml chloramphenicol, subsequently incubating at 30°C for 48 hours. The resulting strain was called *C. glutamicum* ATCC13032/pFE91.

Example 13

Formation of pantothenate by *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

The formation of pantothenate by the *C. glutamicum* strain ATCC13032/pFE91 was tested in the medium CGXII (Keilhauer et al., 1993, Journal of Bacteriology, 175: 5595-5603) with 10 mg/ml chloramphenicol, referred to hereinafter as *C. glutamicum* test medium. This medium is described in Table 5. 50 ml portions of freshly made-up *C. glutamicum* test medium were inoculated with a 16-hour old culture (*C. glutamicum* test medium, 30°C, 150 rpm) with an O.D.₅₆₀ of 0.1. After incubation at

30°C and 150 rpm for 48 hours, the cells were removed by centrifugation at 5000 × g for 10 minutes, the supernatant was sterilized by filtration, and the pantothenate concentration was determined. The cell density was determined as described in Example 9.

The pantothenate was determined (as calcium salt) using the strain *Lactobacillus plantarum* ATCC®8014 as stated in the handbook "DIFCO MANUAL" from DIFCO (Michigan, USA, 10th Edition, 1100-1102 (1984)). The result is shown in Table 6.

Table 5

Substance	Amount per liter	Remark
(NH ₄) ₂ SO ₄	20 g	
Urea	5 g	
KH ₂ PO ₄	1 g	
K ₂ HPO ₄	1 g	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.25 g	
MOPS	42 g	
CaCl ₂	10 mg	
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	
MnSO ₄ ·H ₂ O	10 mg	
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 mg	
CuSO ₄	0.2 mg	
NiCl ₂ ·6H ₂ O	0.02 mg	
Biotin	0.5 mg	
Glucose	40 g	autoclave separately
Protocatechuic acid	0.03 mg	sterilized by filtration

Table 6

Strain	Concentration [µg/ml]	Cell density [OD ₅₈₀]	Productivity [µg/ml/OD ₅₈₀]
ATCC13032	0.2	20	0.010
ATCC13032/pFE91	0.3	20	0.015

Figures

The following figures are appended:

- **Fig. 1:** Map of the plasmid pDB1
- **Fig. 2:** Map of the plasmid pGAD10
- **Fig. 3:** Map of the plasmid pFEBank16
- **Fig. 4:** Map of the plasmid pFE32
- **Fig. 5:** Map of the plasmid pFE65
- **Fig. 6:** Map of the plasmid pFE80
- **Fig. 7:** Map of the plasmid pFE91

The stated numbers of base pairs are approximate values obtained within the scope of the reproducibility.

The abbreviations used in the figures have the following meanings:

rrnBT1T2: transcription terminator of the rrnB gene

P_{tac}: tac promoter

P ADH1: promoter of the ADH1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*

T ADH1: terminator of the ADH1 gene from *Saccharomyces cerevisiae*

repts: thermosensitive origin of replication

ilvC: coding region of the ilvC gene

ilvC': 5' region of the ilvC gene

'ilvC: 3' region of the ilvC gene

panB: coding region of the panB gene

panC: coding region of the panC gene

panD: coding region of the panD gene

panE: coding region of the panE gene

Amp: ampicillin resistance gene

tet': 5' region of the tet gene

'tet: 3' region of the tet gene

Cm: chloramphenicol resistance gene

Gm: gentamicin resistance gene

Ga14: regulator for galactose-inducible genes from *Saccharomyces cerevisiae*

bps: base pairs

EcoRI: cleavage site of the restriction enzyme EcoRI

EcoRV: cleavage site of the restriction enzyme EcoRV

HincII: cleavage site of the restriction enzyme HincII

HindIII: cleavage site of the restriction enzyme HindIII

KpnI: cleavage site of the restriction enzyme KpnI

Sall: cleavage site of the restriction enzyme Sall

Smal: cleavage site of the restriction enzyme Smal

SphI: cleavage site of the restriction enzyme SphI

PvuII: cleavage site of the restriction enzyme PvuII

Claims

1. A process for producing and improving pantothenic acid-producing microorganisms by enhancement, in particular overexpression, of the nucleotide sequences coding for ketopantoate reductase, in particular of the panE gene, singly or combined together, and, where appropriate, additionally of the ilvC gene.
2. A process as claimed in claim 1, wherein to achieve the overexpression the copy number of the genes or nucleotide sequences in the microorganisms is increased by inserting plasmid vectors harboring these genes or nucleotide sequences.
3. A process as claimed in claim 1, wherein to achieve the overexpression the promoter and regulatory regions located upstream of the structural gene are mutated.
4. A process as claimed in claim 1, wherein to achieve the overexpression expression cassettes are incorporated upstream of the structural gene.
5. A process as claimed in any of claims 1 to 4, wherein nucleotide sequences which code for ketopantoate reductase and have one or more metabolite and/or antimetabolite resistance mutations are enhanced, in particular overexpressed, in microorganisms.
6. A process as claimed in any of claims 2 to 5, wherein to achieve the enhancement or overexpression the culture medium and/or the fermentation management is/are changed.
7. A process as claimed in any of claims 1 to 6, wherein the metabolic pathways which diminish pantothenate (pantothenic acid) formation in the microorganisms are eliminated.
8. A process as claimed in claim 7, wherein the avtA gene is switched off.
9. A process as claimed in claim 7, wherein the ilvE gene is switched off.
10. A process as claimed in claim 1, wherein the ilvC gene of C. glutamicum is overexpressed or enhanced in microorganisms, in particular of the genera Corynebacteria or E. coli.
11. A process as claimed in any of claims 1 to 9, wherein, in addition to the nucleotide sequences coding for ketopantoate reductase, there is enhancement, in particular overexpression, of one or more of the genes of the metabolic pathway of pantothenic acid formation.
12. A process as claimed in claim 11, wherein one or more of the genes which code for the enzymes ketopantoate hydroxymethyltransferase (EC 4.1.2.12), aspartate 1-decarboxylase (EC 4.1.1.11) and pantothenate synthetase (EC 6.3.2.1) are additionally enhanced, in particular overexpressed.

13. A process as claimed in claims 11 and 12, wherein different compatible plasmid vectors which comprise said genes are employed.
14. A process as claimed in claims 10 and 11, wherein a strain transformed with one or more mutually compatible plasmid vector(s) is employed, and the plasmid vector harbors one or more of said genes, including the panE gene, in which the genes are arranged consecutively and are under the control of a common promoter or are arranged separate from one another under the control of different promoters.
15. The plasmid vector pFE80, having the restriction map depicted in **Fig. 6** and deposited in the *E. coli* K12 strain MG1655/pFE80 under the designation DSM 12414.
16. The plasmid vector pFE65, having the restriction map depicted in **Fig. 5** and deposited in the *E. coli* K12 strain MG1655/pFE65 under the designation DSM 12382.
17. The plasmid vector pFE32, having the restriction map depicted in **Fig. 4** and deposited in the *E. coli* K12 strain MG1655/pFE32 under the designation DSM 12413.
18. The *E. coli* K12 strain FE6 which harbors a valine resistance.
19. The *E. coli* K12 strain FE7 in which the avtA gene has been replaced by an avtA::aadB fragment, deposited under the designation DSM 12380.
20. A microorganism (host cell) of the genus *E. coli* or *Corynebacterium*, which comprises one of the plasmid vectors as claimed in claims 11 to 14 and, where appropriate, one or more metabolite and/or antimetabolite resistance.
21. *C. glutamicum* ATCC 13032/pFE91 which comprises the plasmid vector pFE91 with the ilvC gene from *C. glutamicum*.
22. A process for producing pantothenic acid, which comprises carrying out the following steps:
 - a) fermentation of microorganisms as claimed in one or more of the preceding claims,
 - b) accumulation of the pantothenic acid in the medium or in the cells of the microorganisms,
 - c) isolation of the pantothenic acid.
23. A process as claimed in claim 22, wherein ketopantoate is added as precursor.
24. A process as claimed in claim 23, wherein in stage a) a precursor of pantothenic acid is added, selected from the group of β -alanine and ketoisovalerate.
25. A process as claimed in one or more of the preceding claims, wherein microorganisms of the genus *E. coli* or *Corynebacterium* are employed.

Key to Figs.

Abb. → Fig.

No title available.

Patent Number: DE19846499
Publication date: 2000-04-20
Inventor(s): ELISCHEWSKI FRANK (DE); DOHMEN JUERGEN (DE); DUSCH NICOLE (DE); FARWICK MIKE (DE); PUEHLER ALFRED (DE); THIERBACH GEORG (DE); KALINOWSKI JOERN (DE)
Applicant(s):: DEGUSSA (DE)
Requested Patent: DE19846499
Application Number: DE19981046499 19981009
Priority Number(s): DE19981046499 19981009
IPC Classification: C12N15/52 ; C12N15/70 ; C12N9/00 ; C12N1/21 ; C12P13/04
EC Classification:
Equivalents: AU5357099, CN1254758, EP1001027, JP2000116387, PL335926

Abstract

Data supplied from the esp@cenet database - I2

